

Université de Montréal

Déterminants du mécanisme de ciblage de la proprotéine convertase
PC5-A vers la voie de sécrétion régulée.

Par

Angela Anton

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire.

Septembre 2004

© Angela Anton, 2004.



QH

506

U54

2005

v. 009

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Déterminants du mécanisme de ciblage de la proprotéine convertase
PC5-A vers la voie de sécrétion régulée.

présenté par

Angela Anton

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Claude Lazure: Président-rapporteur

Dr. Timothy Reudelhuber: Directeur de recherche

Dr. Richard Leduc: Membre du jury

SOMMAIRE

Quelques membres de la famille des proprotéines convertases, incluant PC1, PC2 et PC5-A, possèdent une activité enzymatique ciblée principalement vers les granules de sécrétion denses des cellules endocrines et neuroendocrines. Ces protéases jouent un rôle dans le clivage protéolytique de plusieurs précurseurs inactifs pour générer à l'intérieur des granules de sécrétion la protéine active. L'activité limitée à cette organelle, permet aux protéines actives, emmagasinées dans les granules, d'être libérées lorsque la cellule reçoit un stimulus physiologique. Ce processus est appelé sécrétion régulée. Cette protéolyse dépend du co-ciblage des proprotéines convertases et des précurseurs à l'intérieur des granules de sécrétion. De plus, l'activité de la convertase sur son substrat doit être contrôlée jusqu'à ce que tous les deux se retrouvent dans les granules de sécrétion.

La proprotéine convertase PC1 est responsable de la maturation de plusieurs proprotéines telles que la proinsuline, le proglucagon, la proopiomélanocortine et la prorénine dans les granules de sécrétion des cellules neuroendocrines. Son domaine C-terminal serait nécessaire pour son ciblage vers les granules, et ce, par un mécanisme qui impliquerait la présence d'une structure en hélice α dans ce domaine. La convertase PC5-A qui procède aussi la prorénine, présente plusieurs caractéristiques semblables à PC1. Ces caractéristiques impliquent : 1) le clivage de son prosegment en N-terminal très tôt dans la voie de sécrétion, 2) la perte de son domaine en C-terminal dans les cellules endocrines 3) la présence d'un domaine de ciblage et 4) la prédiction d'une hélice α dans son domaine C-terminal.

Les travaux présentés dans ce mémoire visent à identifier les domaines importants qui ciblent la proprotéine convertase PC5-A vers les granules de sécrétion. Nous avons utilisé une protéine recombinante, constituée du pre- et du prosegment de la prorénine lié à la région Fc de l'immunoglobuline de souris, qui n'est pas normalement ciblée vers les granules "pre-pro-Fc". Cette protéine était fusionnée à différentes portions du domaine C-terminal de PC5-A. Nos résultats montrent que la région en C-terminal de PC5-A possède

un domaine impliqué dans son ciblage vers les granules de sécrétion. Cependant, ce ciblage ne dépend pas de la structure en hélice α mais d'une séquence minimale TEES.

Mots clés : proprotéines convertase, voie de sécrétion régulée, réseau trans-Golgien, granules de sécrétion, PC5-A.

ABSTRACT

Some members of Proprotein Convertase Family, including PC1, PC2 and PC5-A, has an enzymatic activity that is preferentially limited to the dense secretory granules of endocrine and neuroendocrine cells. These proteases have a role in the proteolytic cleavage of several inactive precursors to generate active proteins inside secretory granules. This organelle-limited activity allows the active proteins, stored within these granules, to be released after the cell has received a physiological stimulus. This process is called regulated secretion. This proteolysis requires the presence of both the proproteins convertase and the precursors into the secretory granules. Moreover, the activity of the convertase on its substrate has to be restrained until both reach the secretory granules environment.

The proprotein convertase PC1 is responsible for the maturation of several proproteins such as the prorenin into the secretory granules of neuroendocrine cells. The C-terminal tail of PC1 is required for its targeting to secretory granules by a mechanism that implicated the presence of an α helical structure. The convertase PC5-A, that is also capable to process prorenin, shares several characteristics as PC1, including : 1) the removal of its N-terminal prosegment very early in the secretory pathway, 2) the loss of a C-terminal tail in endocrine cells, 3) the presence of a sorting domain within the C-terminal tail and 4) a predicted α helix in its C-terminal domain.

The goal of this thesis is to identify domains that target the proprotein convertase PC5-A to secretory granules. We used a recombinant protein constituted for the pre- and pro- région of the prorenin fused with the Fc région of the mouse immunoglobulin which is not normally targeted to the granules, fused to different portions of the C-terminal domain of PC5-A. Our results show that the C-terminal region is implicated in the targeting of PC5-A to secretory granules. However, this targeting is not driven by the presence of an α helical structure, but requires the minimal sequence TEES.

Keywords : Convertase Proprotein, Regulated Secretory Pathway, Trans Golgi Network, Secretory Granules, PC5-A.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
ABSTRACT	v
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
REMERCIEMENTS	xvii
INTRODUCTION	1

CHAPITRE PREMIER: INTRODUCTION

1. Transport des protéines à travers les voies de sécrétion	2
1.1 Ciblage des protéines vers la membrane du RE	3
1.2 Repliement des protéines dans le RE	5
1.2.1 Modifications post-traductionnelles dans le RE	5
1.2.2 Protéines chaperones	6
1.2.3 Rétention et dégradation des protéines dans le RE	7
1.3 Sortie des protéines du RE	8
1.4 Transport vésiculaire dans la voie de sécrétion	9
1.5 Formation des groupements vésiculo-tubulaires	11
1.6 Transport des protéines dans l'appareil de Golgi	11
1.6.1 Modifications post-traductionnelle dans l'appareil de Golgi	14
1.7 Tri dans le réseau trans-Golgien	15
1.7.1 Ciblage vers les lysosomes	17
1.7.2 Ciblage vers les granules de sécrétion	18
1.7.2.1 Deux voies différentes de sécrétion	20
1.7.2.2 Biogenèse des granules de sécrétion	21
1.7.2.3 Modifications post-traductionnelle dans les SGs	24
2. Les Pro-hormones convertases (PCs)	25

2.1 Sites de clivages des PCs	28
2.2 Structures des PCs	28
2.3 Les isoformes des PCs	30
2.4 Les PCs de la voie de sécrétion régulée	31
2.4.1 Biosynthèse de PC1	34
2.4.2 Biosynthèse de PC2	35
2.4.3 Biosynthèse de PC5	36
3. Deux modèles pour le tri des protéines vers les MSGs	39
3.1 Modèle de tri par entrée	39
3.2 Modèle de tri par rétention	40
3.2.1 Le processus de rétention: condensation	41
4. Plusieurs mécanismes de ciblage des protéines vers les SGs	43
4.1 L'Agrégation	43
4.2 Le Clivage par les Pro-protéines Convertases	44
4.3 Le Liaison à d'autres enzymes	46
4.4 Le Boucle en N-terminal	46
4.5 L'Association aux lipides	47
5. Hypothèse de travail	48

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériel	53
1.1 Solutions et tampons utilisés pour l'électrophorèse Schägger	55
1.2 Solutions utilisées pour la coloration X-Gal	56
2. Méthodes	57
2.1 Biologie moléculaire	57
2.1.1 Réaction en chaîne à la polymérase (PCR)	57

2.1.2	Digestion enzymatique	58
2.1.3	Extraction et précipitation de l'ADN	58
2.1.4	Ligation	59
2.1.5	Transformation	59
2.1.6	Minipréparation d'ADN	59
2.1.7	Maxipréparation d'ADN	60
2.1.8	Séquençage	60
2.2	Expression des constructions de plasmides	61
2.2.1	Cultures cellulaires	61
2.2.2	Constructions de plasmides recombinants	61
2.2.3	Mutagenèse dirigée	62
2.2.4	Transfection transitoire	63
2.2.5	Coloration β -Gal de cellules transfectées en culture	66
2.2.6	Marquage biosynthétique de protéines et stimulation de la sécrétion de SGs	66
2.2.7	Immunoprécipitation	67
2.2.8	Gel d'électrophorèse de poly-acrylamide (PAGE)	68
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS		69
CHAPITRE 4 : DISCUSSION		86
CONCLUSION		96
RÉFÉRENCES		97

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. Transport vésiculaire guidé par le complexe SNARE. Deux partenaires complémentaires, à savoir SNARE de vésicules (v-SNARE) et SNARE de membranes cibles (t-SNARE), déterminent la sélectivité de l'acostage des vésicules de transport.

FIGURE 2. Le transport des protéines dans les compartiments précoces de la voie de sécrétion.

FIGURE 3. Résumé des modifications post-traductionnelles dans les compartiments de la voie de sécrétion.

FIGURE 4. Parcours des protéines à travers la voie de sécrétion.

FIGURE 5. Représentation de la voie de sécrétion constitutive et régulée.

FIGURE 6. Représentation des membres de la famille des proprotéines convertases.

FIGURE 7. Localisation subcellulaire de PCs et SKI.

FIGURE 8. Quelques précurseurs maturés par des proprotéines convertases de la voie de sécrétion régulée.

FIGURE 9. Représentation des isoformes des Proprotéines Convertases PC5-A/PC5-B et du mutant PC5-A&.

FIGURE 10. Représentation schématique des deux hypothèses du triage de protéines vers les granules de sécrétion matures.

FIGURE 11. Prédiction des hélices α par des algorithmes de Garnier-Osguthorpe-Robson (lignes solides) et de Chou Fasman (lignes discontinues) dans la région en C-terminal de PC1, de PC2 et de PC5-A.

FIGURE 12. Modèle de triage de PCs, avec leurs substrats, vers les granules de sécrétion.

FIGURE 13. Mutagenèse effectuée par PCR.

FIGURE 14. Transfection transitoire avec la trousse Effectene Transfection Reagent.

FIGURE 15. Représentation des constructions de plasmides recombinants avec différentes régions de la queue C-terminale de PC5-A et les deux formes mutantes, dans le vecteur PcDNA3.

FIGURE 16. Coloration X-Gal effectuée dans des cellules AtT20 transfectées avec un plasmide contenant le gène β -Gal.

FIGURE 17. a. Passage de la protéine de fusion pre-pro-Fc à travers les voies de sécrétion
b. Passage de la protéine de fusion pre-propFc-PC5-A(844-881) à travers les voies de sécrétion.

FIGURE 18. La queue C-terminal de PC5-A contient un domaine de triage vers la voie de sécrétion régulée.

FIGURE 19. a. Représentation schématique de la forme native et mutée du plasmide Fc-PC5A(654-881) dans la queue en C-terminal de PC5-A et prédiction de l'hélice α dans cette région
b. Résultats obtenus des transfections transitoires dans les cellules GH4 ayant pour contrôle positif le plasmide Fc-PC5A(654-881).

FIGURE 20. Identification de la séquence de triage minimale dans la région en C-terminal, responsable du ciblage vers la voie de sécrétion régulée de PC5-A dans les cellules GH4.

FIGURE 21. Identification de la séquence de triage minimale dans la région en C-terminal, responsable du ciblage vers la voie de sécrétion régulée de PC5-A dans les cellules AtT20.

FIGURE 22. a. Représentation schématique de la forme native et mutée du plasmide Fc-PC5A(844-881) dans la queue en C-terminal de PC5-A **b.** Résultats obtenus des transfections transitoires dans des cellules GH4.

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I. Conditions de transfection utilisées dans des lignées cellulaires GH4 et AtT20.

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AP	<i>Adaptor Protein</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ANF	facteur atrial-natriurétique
ARF	<i>Adenosine-Diphosphate Ribosylation Factor</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	<i>RNA messenger</i>
AtT20	cellules <i>Corticotrophic</i> de souris
BiP	<i>Immunoglobulin Heavy Chain-Binding Protein</i>
BSC40	<i>Kidney ephitelial cells, African green monkey</i>
Ca ⁺²	ions calcium
CD-MRP	<i>Cation Dependent MRP</i>
CGA	<i>Chromogranin A</i>
CGB	<i>Chromogranin B</i>
CGN	<i>Cis Golgi Network</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary Cells</i>
CI-MPR	<i>Cation-Independent MRP</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
CNX	calnexine
COPI	<i>Coat Protein Complex I</i>
COPII	<i>Coat Protein Complex II</i>
CPE	carboxypeptidase E
CPZ	carboxypeptidase Z
CRT	calréticuline
CSVs	<i>Constitutive Vesicles</i>
DBH	<i>Dopamine β-Hydrolase</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DRM	<i>Detergent Resistant Membranes</i>
EE	<i>Early Endosome</i>
ERAD	<i>ER-Associated Degradation</i>

Fc	portion Fc de la chaîne lourde d'immunoglobuline
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GH4	Cellules <i>Somatomammotrophic</i> de rat
GlcNAc	N-Acétylglucosamine
GPI	<i>Glycosyl-Phosphatidylinositol</i>
GOS-28	<i>Golgi-Associated SNARE of 28 KDa</i>
HSP70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
IgG	Immunoglobuline G
IDVs	<i>ISGs-Derived Vesicles</i>
ISGs	<i>Immature Secretory Granules</i>
LE	<i>Late Endosome</i>
M6P	mannose 6 phosphate
MRP	<i>Mannose 6-Phosphate Receptors</i>
MSGs	<i>Matures Secretory Granules</i>
NARC	<i>Neural Apoptosis-Regulated Convertase 1</i>
NSF	<i>N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor</i>
OST	<i>oligosaccharyl transferase</i>
PAM	<i>Peptidylglycine _-Amidating Monooxygenase</i>
PAPs	3' phosphoadénosine 5' phosphosulfate
PC12	<i>Rat Pheochromocytoma cell line</i>
mPC1	PC1 de souris
PCs	Pro-hormones convertases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDI	Protéine disulfure isomérase
PLD	<i>Phospholipase D</i>
POMC	propiomelanocortine
Pro-VEGF-C	Facteur C de croissance endothéliale pro-vasculaire
Rabs	<i>Ras-related in brain</i>
RE	réticulum endoplasmique
RSPs	<i>Regulated Secretory Proteins</i>
S-S	Ponts disulfures

^{35}S	isotope ^{35}S
SgII	Sécréto granine II
SKI-1	<i>Subtilisin /Kexin-Isozyme-1</i>
SNAP	<i>Soluble NSF-Attachment Protein</i>
α -SNAP-25	<i>Synaptosome-associated protein of 25 KDa</i>
SNAREs	<i>Soluble NFS-Attacment Protein [SNAP] Receptors</i>
SGs	<i>Secretory Granules</i>
SR	<i>SRP receptor</i>
SRP	<i>Signal Recognition Particle</i>
TDM	domaine transmembranaire
TGN	<i>Trans-Golgi Network</i>
t-SNAREs	<i>Target α-SNAP Receptor</i>
UGGP	UDP-glucose: glycoprotéine glucosyltransférase
v-SNAREs	<i>Vesicle α-SNAP Receptor</i>
VTCs	<i>Vesiculo-Tubular Clusters</i>

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier le Dr. Timothy Reudelhuber pour ses encouragements et ses conseils au cours de mes études en tant qu'étudiante à la maîtrise.

Je désire remercier Chantale Mercure pour sa patience, ses conseils, son secours, surtout au début de ma maîtrise ainsi que pour son aide en français pendant la rédaction de mon mémoire. Je remercie également l'équipe du laboratoire pour leur soutien continu.

Merci à Suzanne Benjannet pour la biosynthèse de protéines, à Annie et Dalinda pour son support moral et son amitié.

INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION

1. Transport des protéines à travers les voies de sécrétion

Les cellules eucaryotes possèdent un réseau élaboré de membranes internes qui leur permet d'assurer leur équilibre homéostatique, la communication avec l'environnement tissulaire et avec l'organisme tout entier. Ce réseau de membranes permet aussi à la cellule d'internaliser les macromolécules grâce à un processus appelé endocytose et de les livrer à des enzymes digestives emmagasinées dans les lysosomes. Ce réseau fournit également le moyen de contrôler la libération de protéines et glucides nouvellement synthétisés à l'extérieur. Dans cette voie appelée exocytose, la cellule peut modifier les protéines par une série d'étapes contrôlées, les emmagasiner jusqu'à ce qu'elles en aient besoin et les libérer au niveau d'un domaine de la surface cellulaire.

La plupart des protéines qui transitent à travers les différents compartiments cellulaires des voies de sécrétion, sont confrontées au problème du passage des barrières lipidiques. Au cours de l'évolution, plusieurs mécanismes ont été mis en place pour permettre aux protéines de traverser les membranes sans modifier ni perturber les fonctions essentielles de la cellule. Le transport des protéines, du réticulum endoplasmique (RE) vers l'appareil du Golgi ou de l'appareil du Golgi vers la surface de la cellule, sont assurées par des vésicules de transport. Ces vésicules voyagent de membranes à membranes ou de lumière à lumière ou encore vers l'espace extracellulaire.

Les deux voies majeures de sécrétion des protéines dans certaines cellules endocrines sont la voie constitutive ou par défaut et la voie régulée. Dans le cas de la voie constitutive, les protéines partent directement du RE vers l'appareil de Golgi puis vers la surface de la cellule et sont sécrétées sans stimulation. Alors que dans la voie régulée, les protéines destinées à la sécrétion, après leur arrivée au réseau trans du

Golgi, seront emmagasinées dans des granules de sécrétion (SGs). Les granules fusionneront avec la membrane plasmique suite à un signal puis les protéines seront libérées.

La translocation des protéines nouvellement synthétisées dans le RE constitue la première étape du parcours des protéines dans la voie de sécrétion. La translocation peut s'effectuer de manière post-traductionnelle, qui permet l'import des protéines dans les mitochondries, les chloroplastes, les péroxisomes ou le noyau, après reconnaissance d'une séquence d'adressage spécifique vers la membrane cible correspondante. La voie post-traductionnelle est indépendante des ribosomes et a lieu après la synthèse de la protéine dans le cytosol. Cependant, dans la plupart des cellules mammifères la voie co-traductionnelle prédomine (Rapoport *et al*, 1996). Dans cette voie, l'importation de protéines dans le RE commence avant que la chaîne polypeptidique soit complètement synthétisée.

1.1 Ciblage des protéines vers la membrane du RE

La translocation co-traductionnelle est initiée lorsqu'une séquence-signal de la protéine naissante est guidée vers la membrane du RE par au moins deux éléments : une particule de reconnaissance de la séquence-signal nommée SRP (pour *Signal-Recognition Particule*) qui transite entre la membrane du RE et le cytosol, et un récepteur pour la SRP nommé SRPr (pour *SRP Receptor*) qui est enchâssé dans la membrane du RE.

La SRP des cellules de mammifères est composée d'une molécule d'ARN 7S et de six polypeptides différents appelés SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68 et SRP72. La sous-unité SRP54, de par sa structure, est la sous-unité la plus importante sur le plan fonctionnel. Elle est composée d'un domaine de liaison au GTP en N-terminal et un domaine M, riche en méthionine, en C-terminal (Bernstein *et al*, 1989). Le récepteur SRPr, qui est une protéine intégrale membranaire (Meyer *et al*, 1982), est

composé de deux sous-unités nommées $SR\alpha$ et $SR\beta$ (Tajime *et al*, 1986) qui contiennent chacun également des domaines GTPases (Walter *et Johnson*, 1994). Il semble que des changements conformationnels se produisent au cours des cycles de liaison et d'hydrolyse du GTP au niveau de la SRP et des chaînes du récepteur SRPr. Ces changements garantissent la libération de la SRP, une fois que le ribosome est correctement engagé dans l'appareil de translocation de la membrane du RE. En effet, ces GTPases fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires qui assurent l'unidirectionnalité et la précision du processus de ciblage des protéines vers la membrane du RE (Bourne *et al*, 1990). D'autre part, le peptide signal n'est pas une séquence conservée mais plutôt une séquence hydrophobique de 8 à 12 acides aminés, qui s'associe au domaine riche en méthionine de la SRP.

Dans ce processus, la séquence-signal qui émerge du ribosome est reconnue par la SRP. S'ensuit une interaction étroite qui provoque une interruption de la traduction de la protéine naissante. Enfin, une interaction ultérieure entre la SRP (la SRP fait partie du complexe ribosome-chaîne naissante-SRP) et le récepteur SRPr libère la SRP du ribosome et de la séquence-signal, ce qui permet la reprise de la traduction. Le ribosome se lie également à d'autres composantes de la membrane, formant le complexe hétéromérique Sec61p (composé de trois sous-unités Sec61 α , Sec61 β et Sec61 γ) qui constitue la structure de base du canal de transport des protéines, nommé translocon (Rapoport *et al*, 1996 ; Walter *et Lingappa*, 1986). Les domaines GTPases de SRP54 et de $SR\alpha$ vont promouvoir la progression du complexe ribosome-chaîne naissante-SRP vers la formation de la jonction ribosome-translocon (Walter *et Johnson*, 1994). D'autres composantes du translocon peuvent interagir avec la chaîne naissante pendant son transport pour catalyser des réactions comme le clivage de la séquence signal et la glycosylation. Une fois la translocation terminée, le peptide signal est éliminé du pore de translocation, par coupure, par un signal peptidase et rapidement dégradé en acides aminés par d'autres protéases du RE, tandis que la protéine est libérée dans la lumière du RE (Rapoport *et al*, 1996).

1.2 Repliement des protéines dans le RE

1.2.1 Modifications post-traductionnelles des protéines du RE

Des nombreuses protéines présentes dans la lumière du RE sont en transit vers d'autres destinations ou résident dans la lumière du RE. Certaines protéines résidentes assurent le repliement correct de la plupart de protéines transloquées au lumen du RE. Un exemple est la protéine disulfure isomérase (PDI) qui réside au lumen du RE et catalyse l'oxydation des groupements sulfidryle libres (-SH) pour former des ponts disulfures (S-S). Les ponts disulfures stabilisent les conformations natives de plusieurs protéines (Zapun *et al*, 1999).

L'addition covalente de glucides aux protéines constitue aussi une modification post-traductionnelle du RE. Le processus de N-glycosylation de protéines implique le transfert d'un oligosaccharide en bloc du dolichol intermédiaire vers le groupement d'un résidu asparagine situé dans la séquence -Asn-X-Ser/Thr- (où X peut être tout acide aminé sauf la proline) (Suzuki *et al*, 1998; Kornfeld *et* Kornfeld, 1985; Roth, 1995). Cet oligosaccharide est dit N-lié ou lié à l'asparagine. Dans la plupart des cas, l'oligosaccharide transféré est un (N acétylglucosamine)₂ (mannose)₉(glucose)₃. Cette réaction est catalysée par une enzyme membranaire appelée *oligosaccharyl transférase* (OST), dont le site actif est exposé sur la surface luminale de la membrane du RE. D'autre part, moins fréquemment, des oligosaccharides sont liés au groupement hydroxyle sur la chaîne latérale d'un résidu sérine, thréonine ou hydroxylysine. Ces oligosaccharides O-liés sont formés dans l'appareil de Golgi.

L'extrémité carboxylée de certaines protéines membranaires destinées à la membrane plasmique est liée de façon covalente à un résidu glucidique d'un glycolipide. Cette liaison se forme dans la lumière du RE et elle ajoute à la protéine une molécule d'ancrage, le glycosyl-phosphatidylinositol (GIP), qui contient deux acides gras.

Une séquence hydrophobique de 15 à 20 acides aminés en C-terminal constitue un signal pour l'ajout du GPI (Englund, 1993). Cette modification permet l'ancrage des protéines aux membranes seulement par le lipide d'ancrage GPI et est essentielle à la sortie de ces protéines du RE (Muniz *et Riezman*, 2000).

1.2.2 Protéines chaperones.

Le RE est considéré comme le compartiment spécialisé pour le repliement des protéines de sécrétion. Cet événement est accompli par les chaperones, des protéines résidentes du RE, qui se lient de façon transitoire ou permanente aux protéines mal repliées. Cette association avec les protéines mal repliées permet aux chaperones de stabiliser les conformères instables de ces protéines, facilitant ainsi la formation d'une structure fonctionnelle (Hammond *et Helenius*, 1994).

La protéine de liaison BiP (pour *Immunoglobulin Heavy Chain-Binding Protein*), est la protéine chaperone la plus abondante du RE (Zapun *et al*, 1999). Bip est structurellement apparentée aux membres de la famille des HSP70 (pour *Heat Shock Protein 70*), puisque comme ces derniers, elle reconnaît des protéines repliées de façon incorrecte (Mayer *et al*, 1998). La protéine Bip se lie aux surfaces hydrophobes des protéines participant ainsi à leur translocation à travers le RE (Hammond *et Helenius*, 1994 ; Lyman *et Schekman*, 1997). La protéine Bip prévient l'agrégation des protéines et les aide à rester dans le RE et à se replier normalement en hydrolysant l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire au repliement (Flynn *et al*, 1989).

La calnexine (CNX), une protéine membranaire du RE (Ou *et al*, 1993) et son homologue luminale, la calréticuline (CRT) (Nauseef *et al*, 1995), participent également au repliement des protéines du RE en se liant aux N-glycoprotéines pas complètement repliées (Zapun *et al*, 1999). Ces deux protéines reconnaissent des séquences de carbohydrates présentes dans les protéines nouvellement synthétisées et

assurent leur repliement final avant qu'elles soient exportées du RE (Fielder *et al*, 1996 ; Hebert *et al*, 1995). Cependant une étude propose, que la CNX et la CRT jouent un rôle dans le recrutement des protéines impliquées dans le repliement. L'une des protéines recrutées serait la protéine ERp57, un membre de la famille des isomérases des ponts disulfures (Zapun *et al*, 1998). ERp57 s'associe avec la CNX ou la CRT. Cette association forme le complexe ERp57-calnexine/calréticuline, qui assure la rétention des protéines dans le lumen du RE et assiste leurs repliements en une structure appropriée (Zapun *et al*, 1999).

1.2.3 Rétention et dégradation des protéines dans le RE

Étant donné que les protéines chaperones sont des protéines qui résident dans le RE, leur rétention se fait par l'intermédiaire d'une séquence tétrapeptidique KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) et pour les protéines membranaires, en une séquence KXXX où KKKXX en C-terminal (où X représente tout acide aminé) (Ellgaard *et al*, 1999). Pour les protéines dont le domaine transmembranaire est en N-terminal, ce signal de rétention est remplacé par deux arginines RR (Schutze *et al*, 1994). D'autres protéines résidentes du RE comportent aussi des domaines de liaison aux ions calcium (Ca^{2+}) (Ellgaard *et al*, 1999). De plus, des résidus cystéines exposés peuvent servir de signal de rétention dans le lumen du RE (Fra *et al*, 1993).

Le lumen du RE contient un indicateur pour l'état de repliement des glycoprotéines, la UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase (UGGT), lequel est capable de distinguer entre les substrats correctement repliés et mal repliés (Sousa *et al*, 1992). Cette enzyme additionne un résidu glucose lié $\alpha 1,3$, de sorte qu'elle étiquette les glycoprotéines mal repliées. Cette oligosaccharide monoglucosylée est le substrat pour la CNX et la CRT, qui aident au bon repliement de la protéine. La glucosidase II enlève le résidu glucose et relâche la protéine vers l'appareil de Golgi. Les glycoprotéines mal repliées sembleraient subir plusieurs cycles de liaison et de libération du complexe ERp57-CNX/CRT. Ce complexe interagit avec la protéine

BiP, ce qui éviterait la formation d'agrégats et permettrait aussi de garder ces protéines dans un état propice à leur translocation (Plempner *et al*, 1997 ; Brodsky, 1999). La glucosidase II ne reconnaît pas la conformation du polypeptide, mais sans distinction, enlève les résidus glucose présents (Zapun *et al*, 1997) Si la glycoprotéine est repliée, elle n'est pas reglucosylée et sort du RE vers le Golgi. Si la protéine est mal repliée, elle est reglucosylée par la UGGT et rentre à nouveau dans le cycle. La rétention prolongée des protéines mal repliées dans le RE induit leur dégradation. Dans cette voie de dégradation, les polypeptides transportés vers le cytoplasme sont déglycosylés par le N-glycanase et liés de manière covalente à l'ubiquitine, par des enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (Kopito, 1997). Cela se termine par l'acheminement des protéines vers le protéasome qui a une haute affinité pour les chaînes d'ubiquitine et qui finalement dégrade la protéine (Bonifacino *et* Weisman, 1998).

1.3 Sortie des protéines du RE

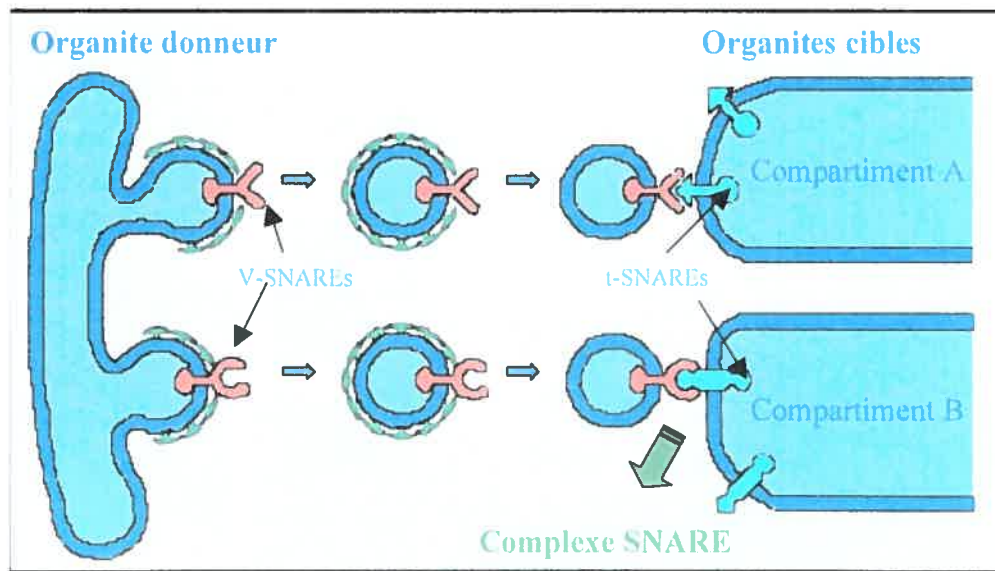
La majorité des protéines repliées dans le RE sont acheminées vers l'appareil de Golgi dans des vésicules de transport qui bourgeonnent du RE. Le bourgeonnement est contrôlé par une petite GTPase cytosolique nommée Sar1p (Nakano *et* Muramatsu, 1989) qui est recrutée à la membrane du RE. Le recrutement des complexes protéiques COPII (pour *Coat Protein Complex II*) qui recouvrent les vésicules (Barlowe, 2002 ; Barlowe *et al*, 1994) est initié par l'activation de Sar1p via la protéine Sec12p (Nakano *et al*, 1988 ; Barlowe *et* Schekman, 1993). Cette protéine catalyse l'échange de nucléotide (Sar1p-GDP par Sar1p-GTP) (Matsuoka *et al*, 1998). Sar1p-GTP promouvoit l'assemblage de Sec23/24p et de Sec13/31p, qui ensemble conduisent aussi au bourgeonnement vésiculaire (Springer *et al*, 1999).

1.4 Transport vésiculaire dans la voie de sécrétion

Les vésicules de transport doivent être sélectives quant à la membrane cible avec laquelle elles fusionnent. Ces réactions de transport de membranes intracellulaires font intervenir des protéines appelées SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*), qui forment des complexes protéiques, contenant des composantes sur la membrane de la vésicule, appelé v-SNAREs, et sur la membrane cible, appelé t-SNAREs. La spécificité de l'ancrage et la fusion des membranes résultent de la reconnaissance d'un t-SNARE par son v-SNARE, ce qui génère le complexe SNARE (McNew *et al*, 2000). (Figure 1). Ce complexe nécessite également des facteurs solubles tels que l'ATPase, NSF (*N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor*) et la protéine α -SNAP (pour α -Soluble NSF-Attachement Protein), qui agissent dans les différentes voies du trafic intracellulaire (Block *et al*, 1988 ; Clary *et al*, 1990). L'énergie d'hydrolyse de l'ATP du NSF déstabilise le complexe SNARE et entraîne la fusion des membranes. D'autres études ont également démontré que ce complexe NSF/ α -SNAP pourrait agir en amont de la formation du complexe SNARE, en induisant un changement de conformation du t-SNARE, nécessaire à la liaison de v-SNARE (Hay *et Scheller*, 1997).

Les vésicules synaptiques et la membrane présynaptique ont permis d'identifier les premiers SNAREs. Les SNAREs synaptiques initialement identifiés étaient VAMP (une v-SNARE) et syntaxin 1 (une t-SNARE) (Bennett *et Scheller*, 1993). De plus, la protéine SNAP-25 (pour *Synaptosome-associated protein of 25 KDa*, une t-SNARE) était identifiée chez les mammifères dans le transport non neuronal du Golgi à la membrane plasmique, mais pas dans un transport ultérieur dans la voie de sécrétion (Ravichandran *et al*, 1996). Bien que ces trois catégories de protéines, (VAMP, syntaxin 1 et SNAP 25) étaient prouvées être utile pour le transport vésiculaire, quelques SNAREs telles que GOS-28 (pour *Golgi-associated SNARE of 28 KDa*) n'est assignée à aucune de ces familles de protéines. De plus, quelques protéines qui fonctionnent comme t-SNAREs, peuvent également fonctionner comme v-SNAREs (Walch-Solinema *et al*, 1995 ; Tagaya *et al*, 1996).

Figure1. Transport vésiculaire guidé par le complexe SNARE.
Deux partenaires complémentaires, à savoir SNARE de vésicules (v-SNARE) et SNARE de membranes cibles (t-SNARE), déterminent la sélectivité de l'acostage des vésicules de transport.



Par ailleurs, de par leur nombre, les systèmes membranaires présents dans la cellule requièrent une sélectivité élevée qui serait contrôlée par la famille des GTPases, les Rabs (pour *Ras related in brain*). Ces protéines se retrouvent dans le cytosol sous une forme inactive liée au GDP. Alors les membranes des vésicules de transport comportent des Rabs-GTP qui sont hydrolysées suite à la fusion des membranes. Plusieurs études suggèrent que les protéines Rabs interagissent directement avec v- ou t-SNAREs et les activent, contribuant ainsi à l'assemblage du complexe SNARE (Lian *et al*, 1994 ; Lupashin *et Waters*, 1997).

1.5 Formation des groupements vésiculo-tubulaires

Les vésicules, libérées des complexes COPII fusionnent avec une cavité centrale remplie d'un ensemble de vésicules et de tubules sinueux (Bannykh *et al*, 1996 ; Letourneur *et al*, 1994 ; Tooze *et al*, 1988 ; Saraste *et Kuismanen*, 1984) nommé groupements vésiculo-tubulaire ou VTCs. Les vésicules, formées à partir de ce compartiment intermédiaire, entre le RE et le Golgi, contiennent une enveloppe dense différente à COPII, nommée COPI (pour *Coat Complex Protein I*). Le complexe COPI est recruté à la membrane de vésicules par l'action d'une GTPase appelée Arf1 (Kreis *et al*, 1995). La protéine Arf1 assure le transport rétrograde des protéines, des VTCs et du Golgi vers le RE. En effet, le complexe COPI sert d'intermédiaire pour la formation des vésicules de transport, ce qui favorise le triage et la concentration sélective des protéines contenant des motifs di-lysine et di-phenylalanine (Fiedler *et Simons*, 1996 ; Sohn *et al*, 1996).

1.6 Transport des protéines dans l'appareil de Golgi

La nature du mécanisme par lequel les VTCs libèrent des vésicules de transport, en aval, vers l'appareil du Golgi demeure controversée. En effet, un modèle propose que les COPI servent d'intermédiaire pour un transport bidirectionnel. Cette idée

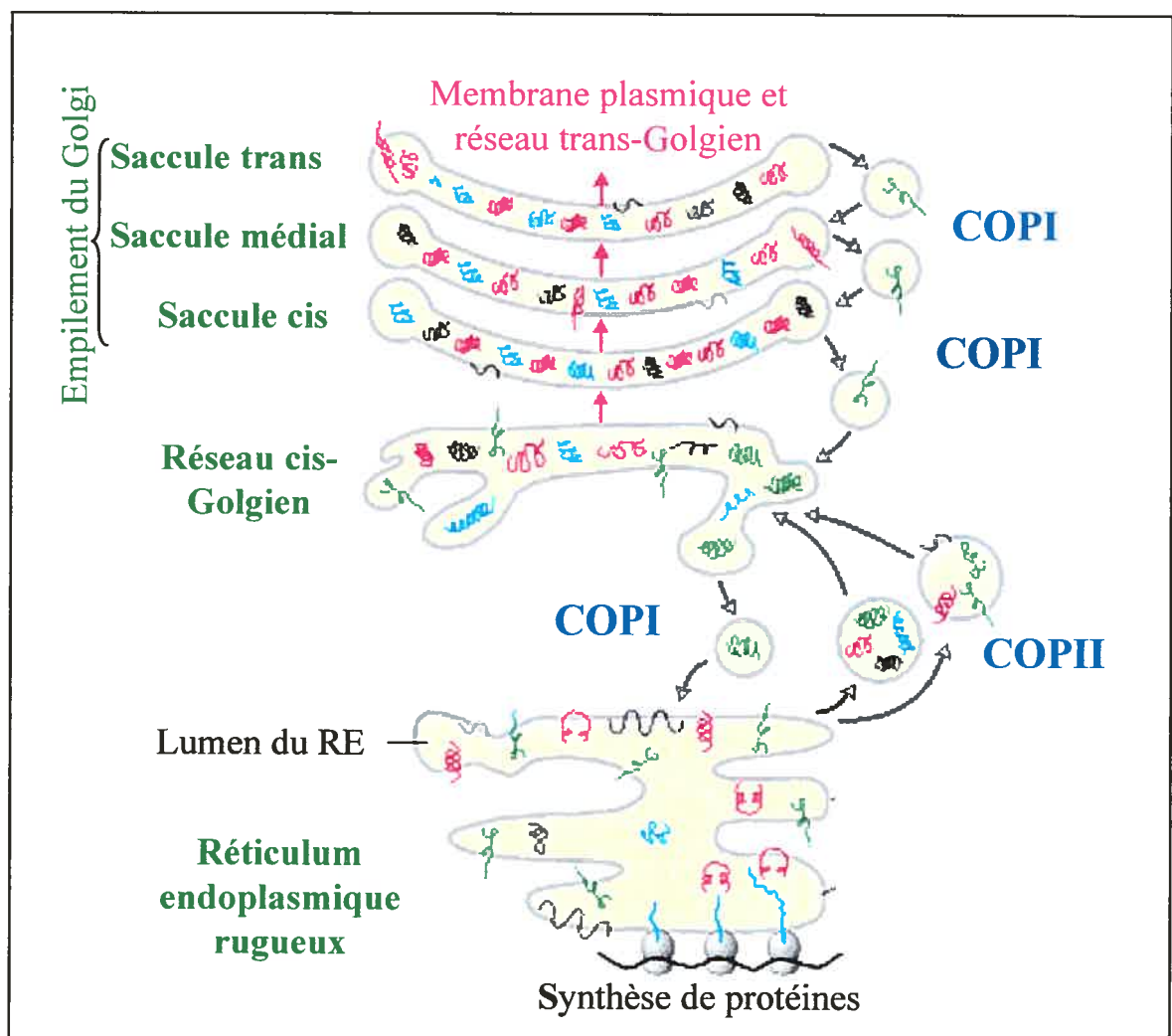
dérive de la suggestion que le transport antérograde entre les empilements de l'appareil du Golgi est effectué par des vésicules COPI (Rothman *et* Wieland, 1996). Le mouvement entre les VTCs et le Golgi pourrait concerner un type de COPI qui prend spécialement les vésicules de transport antérograde pendant la ségrégation des vésicules du transport rétrograde. Ceci nécessiterait de multiples isoformes de COPI ou des protéines adaptatrices qui ne reconnaîtraient pas les motifs di-lysine ou di-phenylalanine ou encore une machinerie qui reconnaîtrait les vésicules de transport antérograde indépendamment. De plus, une étude indique qu'au moins deux types différents de vésicules COPI effectuent le transport à travers les piles du Golgi, un type hautement enrichi dans le trafic rétrograde et un autre contenant des vésicules de transport antérograde (Orci *et al*, 1997). Cependant, cette étude ne démontre pas que les protéines COPI peuvent se déplacer vers le compartiment trans-Golgien.

Un second modèle propose une maturation dirigée qui pourrait avoir lieu à travers l'activité de la machinerie de recyclage de COPII. Cette activité implique la récupération sélective des enzymes du Golgi (Bannykh *et* Balch, 1997). Le compartiment cis-Golgien (CGN), dérivé de la fusion homotypique des COPII et des VTCs, pourrait être modifié de manière transitoire. Cette modification transitoire se fait à travers une fusion hétérotypique des vésicules COPI contenant des enzymes de la région cis et médiale du Golgi. Ces régions seraient transférées aux compartiments médiaux et trans du Golgi par un mécanisme similaire à COPI (fusion hétérotypique). Plusieurs études offrent des évidences convaincantes qui appuient la maturation dirigée (Bannykh *et* Balch, 1997 ; Pelham, 1998).

La figure 2 montre le transport des protéines dans les compartiments précoces de la voie de sécrétion.

Figure 2. Le transport des protéines dans les compartiments précoces de la voie de sécrétion.

Le transport entre le RE et l'appareil de Golgi implique des vésicules couvertes des complexes COPI et COPII



1.6.1 Modifications post-traductionnelles dans l'appareil de Golgi

Les protéines nouvellement synthétisées continuent à être modifiées dans la lumière de l'appareil de Golgi. Les enzymes qui catalysent toutes ces réactions se retrouvent spécifiquement dans les sub-compartiments sacculaires distincts du Golgi.

La phosphorylation de résidus thréonine ou serine (Ma *et al*, 1999) constitue le début des modifications qui ont lieu dans l'appareil de Golgi. Les oligosaccharides N-liés vont être également remodelés dans le compartiment du Golgi. Par ailleurs, certaines protéines ont également des glucides ajoutés sur le groupement -OH des chaînes latérales (Kornfeld, 1998). Cette O-glycosylation et l'addition des chaînes de glucosaminoglycane aux protéines, pour former des protéoglycanes, constituent des modifications catalysées par une série de glycosyls transférases. D'autre part, la sulfatation, des résidus tyrosines sélectionnées, se produit également dans un compartiment golgien tardif (Niehrs *et* Huttner, 1990).

Les oligosaccharides N-liés qui sont ajoutés aux protéines dans le RE, sont souvent élagués initialement par élimination de résidus mannose, et des glucides supplémentaires y compris des résidus N-acétylglucosamine (GlcNAc), galactose et acide sialique sont ajoutés (Varki, 1993). Par ailleurs, l'O-glycosylation des glycoprotéines est catalysée par une série d'enzymes nommées glycosyl transférases (Jentoff, 1990). Elle utilise les nucléotides glucidiques pour ajouter à une protéine un résidu glucidique à la fois. L'ajout d'un N-acétylgalactosamine aux protéines précède l'addition d'un nombre variable de résidus glucidiques supplémentaires, allant de quelques-uns à 10 ou plus (Kornfeld, 1998). Les oligosaccharides permettent de moduler l'activité biologique de certaines protéines. Cette modification tend à rendre une glycoprotéine relativement résistante à la digestion protéique, assurant certaines interactions cellulaires et servant de signaux pour le ciblage intracellulaire des protéines.

La sulfatation constitue une réaction catalysée par une tyrosylprotéine sulfotransférase TPST (pour *tyrosyl-protein sulfotransferase*). Cette enzyme transfère

un sulfate du 3' phosphoadénosine 5' phosphosulfate (PAPS) (Niehrs *et* Huttner, 1990) aux résidus tyrosines présentes dans des régions acides de la protéine. Cet événement se produit dans les compartiments tardifs du Golgi et correspond à une des dernières modifications avant que la protéine sorte vers d'autres compartiments sub-cellulaires (Niehrs *et* Huttner, 1990). La sulfatation augmenterait la demi-vie des peptides hormonaux étant donné que les groupes sulfate les protègent de la dégradation (Huttner, 1988)

La plupart des enzymes de glycosylation du Golgi possèdent des signaux de rétention leur permettant être ancrées à la membrane du Golgi par leur peptide signal non clivé. Des domaines de triage non cytosoliques ont été détectés dans ces protéines. De plus, la présence de domaines transmembranaires d'environ 17 acides aminés ainsi que les régions entourant ces domaines, permet de promouvoir leur localisation au Golgi (Machamer, 1993 ; Nilsson *et al*, 1993). Plusieurs mécanismes de rétention des protéines membranaires ont été proposés : l'agrégation à travers les domaines luminaux et les domaines d'ancrage à la membrane du Golgi, nommés *Kin-Protein aggregation* (Pelham, 1995), la localisation déterminée par la longueur du domaine transmembranaire (Munro, 1995) et finalement le triage effectué par la bi-couche lipidique (Pelham *et* Munro, 1993).

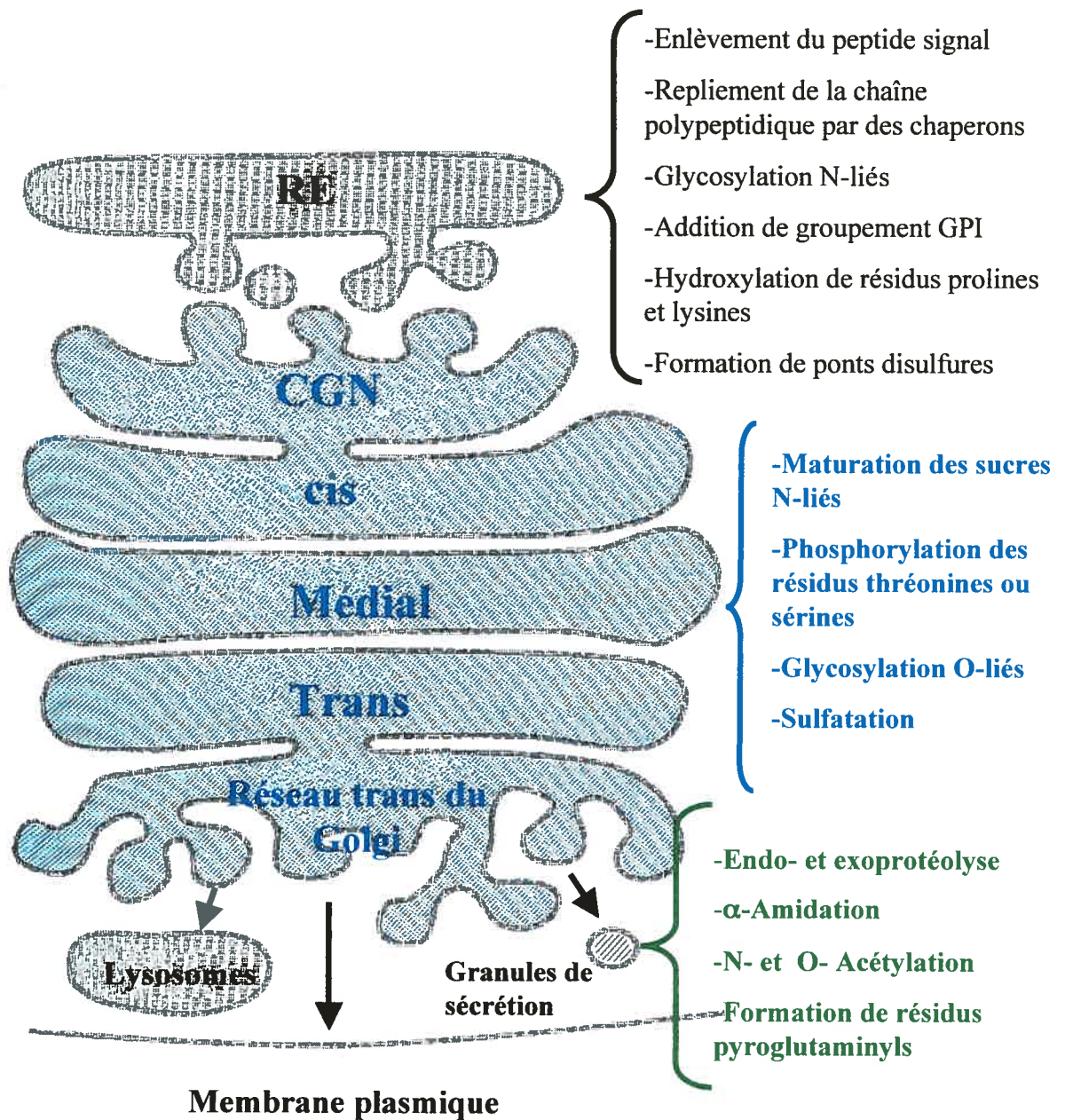
La figure 3 montre les modifications post-traductionnelles dans les compartiments du RE et de l'appareil de Golgi.

1.7 Tri dans le réseau trans-Golgien

Toutes les protéines qui traversent l'appareil de Golgi, excepté celles qui sont retenues en permanence, sont triées dans le réseau trans-Golgien (TGN), vers les lysosomes, directement vers la membrane plasmique ou encore vers les granules de sécrétion (Allan *et* Balch, 1999).

Les vésicules qui bourgeonnent du TGN sont principalement recouvertes de clathrine comme un complexe protéique composé de trois grosses et trois petites chaînes

Figure 3. Résumé des modifications post-traductionnelles dans les compartiments de la voie de sécrétion



polypeptidiques qui forment ensemble une structure à trois jambes appelée triskèle (Schmidt, 1997). Une seconde protéine dans ces vésicules est l'adaptine, recrutée comme un complexe de plusieurs sub-unités : AP-1, AP-3 et AP-4 impliqués dans le transport à partir du Golgi ou des endosomes ; et AP-2 impliqué dans l'endocytose à la membrane plasmique (Dell'Angelica *et al*, 1999). La protéine GTPase monomérique, appelée ARF, pourrait jouer un rôle dans l'assemblage des manteaux de clathrine (Stamnes *et Rothman*, 1993, La Borgne *et al*, 1996). L'assemblage du manteau sur ces vésicules recouvertes de clathrine et d'adaptine, procurerait la force mécanique permettant de tirer la membrane dans le bourgeon, et il aiderait à capturer des récepteurs membranaires spécifiques ainsi que leurs molécules de chargement liées.

D'autre part, les protéines localisées dans le TGN ne sont pas retenues mais circulent plutôt entre ce compartiment et d'autres régions sub-cellulaires. Les protéines membranaires furine et TGN38 sont deux exemples de protéines qui retournent de la membrane plasmique vers le TGN. Elles possèdent un signal de localisation au TGN à l'intérieur de leurs queues cytosoliques représenté soit par le tétrapeptide Y-XX- ϕ (où X est tout acide aminé et ϕ est un acide aminé hydrophobe et volumineux), soit par le motif LL, qui consiste en un doublet de résidus leucine. Les complexes AP interagissent directement avec au moins des deux types de séquence (Dell'Angelica *et al*, 1999).

1.7.1 Ciblage vers les lysosomes

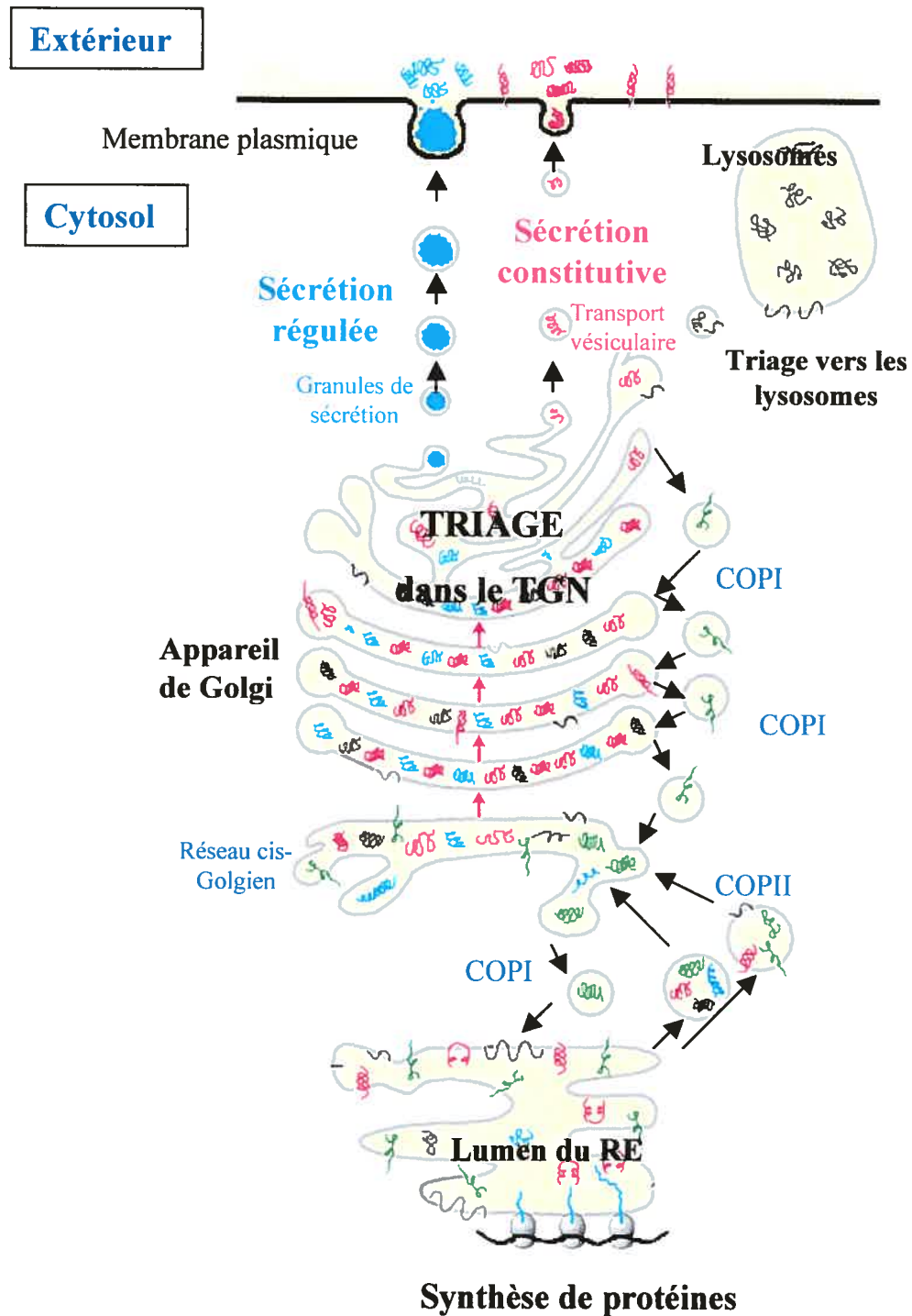
Le lysosome constitue une organelle spécialisée dans la digestion intracellulaire. Il contient des protéines membranaires uniques et une variété d'enzymes hydrolytiques dont l'activité est maximale à pH=5, ce qui correspond au pH interne des lysosomes. Les hydrolases lysosomiales contiennent des oligosaccharides N-liés qui sont spécifiquement modifiés de façon covalente dans le réseau cis-Golgien, de sorte que leurs résidus mannose soient phosphorylés. Par conséquent les hydrolases sont

étiquetées avec des résidus mannose-6 phosphate (M6P), lequel est reconnu par le récepteur MRP (*Mannose 6-Phosphate Receptors*) à pH=7 dans le réseau trans-Golgien. Ce signal est en effet reconnu par deux types de récepteurs : le MRP indépendant des cations **CI-MPR** (pour *Cation-Independent MRP*) et le MRP dépendant des cations **CD-MRP** (pour *Cation Dependent MRP*) (Dahms et Kornfeld, 1989). Au Golgi, les hydrolases lysosomiales seraient emballées à l'intérieur des vésicules recouvertes de clathrine (Schmidt, 1997). Les vésicules recouvertes de clathrine se fusionnent avec les endosomes précoces EE (pour *Early endosomes*), dont la maturation génère les endosomes tardifs LE (pour *Late Endosomes*) ou encore se fusionnent directement avec le lysosome (Marsh et McMahon, 1999)

1.7.2 Ciblage vers les granules de sécrétion

Les granules de sécrétion sont des organelles spécialisées qui servent à l'emmagasiner de produits de sécrétion sélectionnés (O'Connor *et al*, 1986 ; Cohn *et al*, 1982). Elles représentent une structure complexe contenant des enzymes de biosynthèse tels que la DBH (pour *Dopamine β -Hydroxylase*), la protéine PAM (pour *Peptidyl-Glycine α -Amidating Monooxygenase*), la CPH (pour *Carboxypeptidase H*) (Eipper *et al*, 1983; Mains et Eipper, 1984 ; Von Zastrow *et al*, 1986 ; Lynch *et al*, 1986) ; ainsi que des cofacteurs d'enzymes, tel que l'acide ascorbique (Beers *et al*, 1986 ; Levine *et al*, 1985). Les enzymes présentent dans les granules de sécrétion catalysent les dernières modifications que les protéines subissent avant d'être sécrétées. Des études ont permis d'estimer le temps de stockage des peptides à l'intérieur de la cellule. Elles ont démontré que les peptides passent plus de temps dans les granules de sécrétion que dans d'autres compartiments sub-cellulaires (Mains *et al*, 1983 ; Eipper et Mains, 1980 ; May et Eipper, 1980). En effet, le temps du transit de protéines à l'intérieur des granules est de plusieurs heures, pendant que par exemple le temps de transit des protéines dans la voie de sécrétion constitutive est

Figure 4. Parcours de protéines à travers la voie de sécrétion



typiquement de quelques minutes. La figure 4 montre le parcours de protéines à travers la voie de sécrétion.

1.7.2.1 Deux voies différentes de sécrétion.

Comme mentionné dans la section 1, les deux principales voies de sécrétion d'une cellule endocrine sont la voie de sécrétion constitutive et la voie de sécrétion régulée (Kelly, 1985).

La **voie de sécrétion régulée** (Miller *et* Moore, 1990), probablement la plus spécialisée, est caractérisée par la concentration du matériel à l'intérieur des granules de sécrétion très denses lorsque visualisées par microscopie électronique. Ces granules sont emmagasinés dans la cellule pendant des heures ou des jours jusqu'à leur fusion avec la membrane plasmique par un secrétagogue spécifique (Gumbiner *et* Kelly, 1982). La fusion des granules de sécrétion avec la membrane plasmique est un processus actif qui nécessite des changements au niveau de seconds messagers cytoplasmiques comme le calcium et l'AMP cyclique (Rindler, 1992). Le principal objectif de cette voie est d'augmenter la libération du matériel emmagasiné, dans un temps déterminé. En absence de stimuli, cette libération peut se faire mais de façon beaucoup plus faible. Quand l'exocytose est déclenchée, des modifications du cytosquelette sous-membranaire, en particulier les filaments d'actine, permettent l'ancrage granulaire. Un système complexe de signaux externes, stimulateurs et inhibiteurs, régule une cascade d'événements associés à l'exocytose. Donc, cette cascade inclut des récepteurs ainsi que des seconds messagers (Kreiss, 1992).

La **voie de sécrétion constitutive** est caractérisée par la fusion continue de petites vésicules avec la membrane plasmique (Wieland *et al*, 1987). Ces vésicules ne sont pas électron dense et leur sécrétion est étroitement liée à la biosynthèse protéique. La sécrétion augmentée par la voie de sécrétion constitutive est causée par la synthèse protéique augmentée et non pas à une stimulation via des seconds messagers. Cette

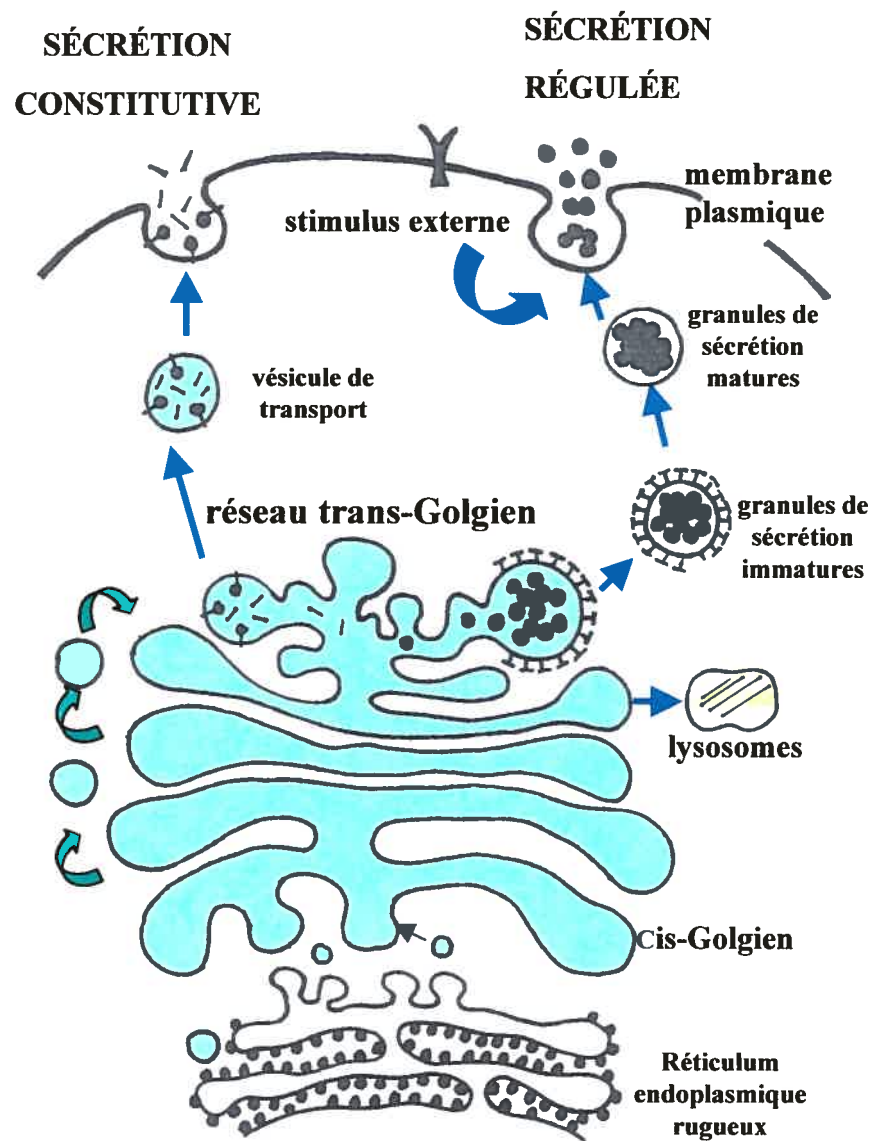
voie est essentiellement utilisée pour la libération de protéines membranaires, présentes dans toutes les cellules ainsi que pour des protéines qui ont besoin d'un niveau relativement constant de sécrétion.

Par conséquent, ces deux voies se distinguent par leur cinétique de sécrétion. Le transit des protéines du TGN vers la membrane plasmique, par la voie constitutive, est un processus continu (Karrenbauer *et al*, 1990). En revanche, dans la voie de sécrétion régulée, les protéines peuvent être, longtemps, emmagasinées à l'intérieur de SGs, quelque fois des heures ou plus d'une journée, avant d'être libérées (Halban *et Irminger*, 1994). La figure 5 montre une représentation des deux principales voies de sécrétion.

1.7.2.2 Biogenèse des granules de sécrétion

La formation des granules de sécrétion denses débute dans le TGN et se termine par l'emmagasinage de RSPs (pour *Regulated Secretory Proteins*) qui se concentrent dans les MSGs (pour *Mature Secretory Granules*). Initialement, ces granules ont une demie-vie courte et sont dites granules de sécrétion immature ISGs (pour *Immatures Secretory Granules*). Ces ISGs subissent un processus de maturation, au cours duquel les vésicules dérivées des granules de sécrétion immatures IDVs (pour *ISGs-Derived Vesicles*) éliminent les molécules qui ne sont pas destinées aux MSGs. Les ISGs représentent donc les précurseurs des MSGs, plutôt qu'une sous population de ceux-ci. En effet, des études menées sur des cellules PC12 (cellules neuroendocriniennes possédant les deux voies de sécrétion) ont montré que la biogenèse des SGs implique la formation des ISGs du TGN ainsi que leur conversion à MSGs. Ainsi, la taille et la densité des granules augmentent au cours du processus de maturation. Les ISGs constituent une structure granulaire qui a un cœur dense d'environ 80 nm (Tooze *et Huttner*, 1990). Cependant l'observation au microscope électronique de MSGs révèle un noyau protéique plus dense et opaque que tous les granules, qui augmente au fur et à mesure de la maturation (Tooze *et al*, 1991). La demie-vie des ISGs est estimée à environ 45 minutes, ce qui est relativement court par rapport à la

Figure 5 . Représentation de la voie de sécrétion constitutive et régulée.



longévité des MSGs. Ceux-ci, en absence de stimulation, peuvent attendre plus d'une journée dans la cellule, avant d'être sécrétés (Tooze *et al*, 1991). Le processus de maturation s'accompagne de phénomènes d'acidification progressive ainsi que de perte du manteau de clathrine (Tooze S, 1996).

D'autre part, le bourgeonnement des CSVs (*Constitutive Vesicles*) et des ISGs (*Immatures Secretory Granules*) se fait à partir du TGN. La formation des CSVs semble être régulée par des protéines hétérotrimériques liées aux GTP (Leyte *et al*, 1992 ; Ohashi *et al*, 1994). Une fonction particulière de ces protéines implique la protéine ARF (pour *Adenosine-Diphosphate Ribosylation Factor*) (Barr *et al*, 1996 ; Chen *et al*, 1996), qui lorsqu'elle est liée au GTP, recrute des protéines du cytosol à la membrane des granules. Il a été démontré que l'ARF activerait la phospholipase D (PLD) (Brown *et al*, 1993 ; Cockcroft *et al*, 1994) et stimulerait également le bourgeonnement du TGN dans des cellules GH4 (Cellules *Somatomammotrophic* de rat) (Chen *et al*, 1997). Enfin, l'ARF et la PLD favoriseraient le bourgeonnement du TGN par l'intermédiaire d'une cascade de signalisations (Tooze S, 1988). D'autres études ont permis l'identification de deux protéines hautement homologues, dans les membranes des SGs : la phogrin et l'autoantigène ICA 512 (Solimena *et al*, 1996 ; Wasmeier *et al*, 1996). Ces protéines sont impliquées également dans la phosphorylation des tyrosines dans la biogenèse et/ou la fonction des SGs. De plus, il existe plusieurs membres responsables du processus de biogenèse de SGs comprenant les granines tels que la Chromogranine A (CGA), la Chromogranine B (CGB) ou sécrétogranine I, la sécrétogranine II (SgII) (Huttner *et* Natori, 1995) et la sécrétogranine III (SgIII) (Ottiger *et al*, 1990). Ces protéines sont présentes en abondance dans les neurones, les cellules exocrines, endocrines et neuroendocrines (Winkler *et al*, 1992 ; Helle K, 1990; Iacangelo *et* Eiden, 1995; Taupenot *et al*, 2003) et constituent une famille de protéines acides (pI=5). La CGA jouerait un rôle d'interrupteur dans la biogenèse des SGs (Kim *et al*, 2001). Le rôle de la CGB paraît être plus important que celui de la CGA, étant donné qu'elle induit la formation de SGs dans les cellules COS-7 et les cellules NIH3T3 (Hoon Huh *et al*, 2003).

1.7.2.3 Modifications post-traductionnelle dans les SGs

En plus des modifications post-traductionnelles subies par les protéines le long de la voie de sécrétion précoce, d'autres modifications peuvent avoir lieu dans le compartiment final des granules de sécrétion. Ces modifications se matérialisent par le clivage endoprotéolytique de précurseurs inactifs. Aussi, l'exoprotéolyse du peptide engendre des modifications finales en N- ou C- terminal telles que la α -N-acétylation, la O-acétylation, la formation de résidus acides pyroglutaminyls et la α -amidation (Lynch *et* Snyder, 1986; Gainer *et al*, 1985 ; Mains *et al*, 1983 ; Herbert *et al*, 1986).

Les fragments protéiques générés par le clivage des protéines entraînent l'exposition des acides aminés basiques en C-terminal, qui sont éliminés par l'action de carboxypeptidases tels que la carboxypeptidase E (CPE) (Fricker *et al*, 1991). La CPE est la carboxypeptidase la mieux caractérisée. En effet, elle est présente à l'intérieur des SGs de plusieurs tissus endocriniens incluant la glande surrénale et la glande pituitaire (Fricker, 1988). Son activité protéolytique a lieu à l'intérieur des SGs à un pH de 5,6 ce qui correspond au pH optimal à l'intérieur des granules de sécrétion matures. Contrairement à la CPE, la carboxypeptidase Z (CPZ) et la carboxypeptidase D (CPD) ne semblent pas correspondre à une enzyme de la voie de sécrétion régulée. L'activité de la CPZ n'est pas détectable à un pH de 5,5, ce qui indique qu'elle n'est pas fonctionnelle dans les SGs (Song *et* Fricker, 1997). Cependant, la CPD démontre une activité aux pH acides entre 5 et 6 mais sa localisation indique qu'elle se trouve au niveau du TGN (Varlamov *et al*, 1995).

Par ailleurs, l' α -amidation du résidu en C-terminal correspond aussi à une étape de maturation des protéines dans les SGs et confère aux peptides un groupement amide non-ionisable (Eipper *et al*, 1992). Cet événement est indispensable dans la plupart de cas pour la bioactivité et la stabilité des peptides. L' α -amidation est catalysée par l'enzyme peptidylglycine α -amide monooxygénase (PAM). La protéine PAM présente deux domaines : un domaine monooxygénase (PHM) qui convertit le résidu glycine en position C-terminal en résidu hydroxyglycine et un domaine lyase PAL

qui complète la réaction et génère le peptide amidé et le glyoxylate (Eipper *et al*, 1992).

La figure 3 montre un résumé des modifications post-traductionnelles dans les différents compartiments de la voie de sécrétion incluant les SGs.

2. Les Pro-hormones convertases (PCs)

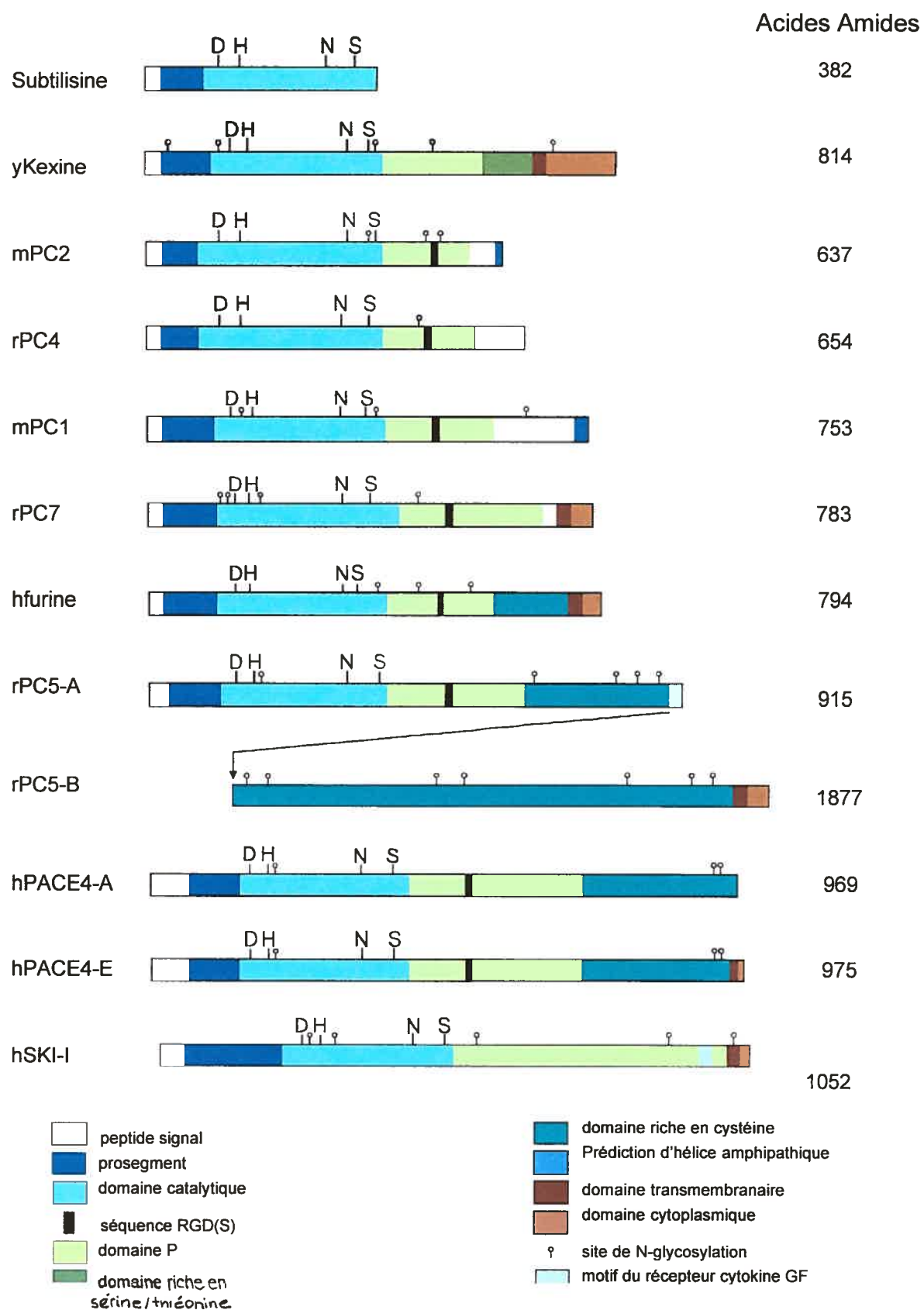
Plusieurs protéines et peptides biologiquement actifs sont souvent générés par la protéolyse intracellulaire des précurseurs inactifs (Steiner *et al*, 1974; Neurath, 1989). Ce processus a lieu fréquemment aux résidus monobasiques et aux paires d'acides aminés basiques dans des précurseurs de neuropeptides, d'hormones, de récepteurs, d'enzymes protéolytiques, de facteurs de croissance, de molécules d'adhésion cellulaire et de glycoprotéines de surface cellulaire d'espèces pathogéniques tel que les virus et les bactéries. Les enzymes responsables de ce clivage chez les mammifères appartiennent à la famille des sérines proteinases de type subtilisine/kexine dépendante du calcium appelées proprotéines convertases PCs.

Les travaux initiés à la fin des années soixante par Steiner, Oyer et Chrétien ont mené à l'identification des premières PCs chez les mammifères. Steiner et Oyer démontrèrent que l'insuline était synthétisée sous forme de propolypeptide, dont l'activation nécessitait un processus protéolytique (Steiner *et Oyer*, 1966). Au même temps, plusieurs travaux sur la maturation de la β -LPH ont été effectués par Chrétien. Dix ans plus tard, il a été démontré que ce processus engendrait plusieurs produits à partir du même précurseur (Mains *et Eipper*, 1977). Par la suite, une étude sur l'albumine a révélé qu'elle était, dans un premier temps, synthétisée en tant que proprotéine prolongée en N-terminal (Judah *et al*, 1973), (Quinn *et al*, 1975) et qu'elle subissait ensuite un clivage à l'intérieur de la voie de sécrétion constitutive (Judah *et al*, 1978).

Au début des années quatre-vingt-dix, des études des bases de données chez les mammifères, a permis de déceler des homologies de séquences entre la kexine et la furine, en particulier dans des régions entourant la triade catalytique (Roebroek *et al*,

1986 ; Van Den Ouweland *et al*, 1990). Ensuite, l'isolement chez les mammifères de deux convertases homologues à l'enzyme kexine a mis en évidence deux enzymes nommés PC1/PC3 (Seidah *et al*, 1990 ; Seidah *et al*, 1991a,b) et PC2 (Seidah *et al*, 1990; Smeekens *et al*, 1990) lesquels correspondent aux principaux enzymes de la voie de sécrétion régulée (Bennett *et al*, 1992; Bailyes *et al*, 1992). D'autres convertases ont été identifiées par la suite : PACE4 (Kiefer *et al*, 1991), PC4 (Nakayama *et al*, 1992a ; Seidah *et al*, 1992), PC5/PC6 (Lusson *et al*, 1993 ; Nakagawa *et al*, 1993a) et PC7/PC8/SPC7/LPC (Bruzanniti *et al*, 1996 ; Meerabux *et al*, 1996 ; Seidah *et al*, 1996c). La plupart de ces proprotéines convertases agissent à l'intérieur de la voie de sécrétion constitutive, y compris la furine, quoique cette dernière soit connue pour pénétrer à l'intérieur des granules de sécrétion immatures (Dittie *et al*, 1997). Deux nouvelles PCs ont été récemment caractérisées. La première est une protéinase de type I liée aux membranes nommée **SKI-1/SP1** (pour Subtilisin/Kexin-Isozyme-1) (Seidah *et al*, 1999). La SKI-1 a été découverte par PCR en utilisant des oligonucléotides dérivés de sérines protéinases reliées aux subtilisine/kexine. SKI constitue probablement une nouvelle famille d'isozymes kexine subtilases ayant pour caractéristique de cliver leurs substrats au niveau de résidus non basiques plutôt qu'au niveau de paires d'acides aminés basiques (Bakary *et al*, 1999). La deuxième PCs est la protéine **NARC-1/PC9** (pour Neural Apoptosis-Regulated Convertase1) qui constitue le neuvième membre de la famille des subtilases. Cette enzyme a été identifiée dans un chromosome présent dans un secteur du génome associé à la régulation par le cholestérol (Abifadel *et al*, 2003 ; Seidah *et al*, 2003). La figure 6 montre une représentation des membres de la famille des PCs.

Figure 6. Représentation schématique des membres de la famille des protéines convertases.



2.1 Sites de clivages des PCs

Sept PCs montrent une spécificité de clivage aux sites basiques respectant la séquence consensus **(R/K)-(X)n-(K/R)↓** (où X peut être presque tout acide aminé, mais généralement pas la Cys, ↓ représente le site de clivage et n=0,2,4,6). Elles comprennent : **la furine, PC1/3, PC2, PC4, PACE4, PC5/6 A/B** (où A et B représentent l'épissage alternatif d'un même transcrit) et **PC7/LPC** (Steiner, 1998 ; Zhou *et al*, 1999 ; Seidah *et Chretien*, 1999).

Il y a aussi une protéolyse limitée, quoique moins généralisée, qui peut avoir lieu aux acides aminés tels que Leu, Val, Met, Ala, Thr ou Ser (Docherly *et* Steiner, 1982 ; Seidah *et al*, 1998). En effet, l'isozyme SKI-1/S1P clive des substrats aux résidus non basiques à l'intérieur du motif **(R/K)-X-(hydrophobique)-(L, T,K,F) ↓** (où X peut être presque tout acide aminé, L=leucine, T=thréonine, K=lysine, F=phenylalanine et ↓ représente le site de clivage). Par ailleurs, pour la protéine NARC-1, il n'y a pas d'information jusqu'à présent au sujet du clivage spécifique, de sa fonction biologique ou de son activité ni de son expression cellulaire et tissulaire (Seidah *et al*, 2003).

2.2 Structures des PCs

Les PCs possèdent des similitudes structurelles qui comprennent :

Le peptide signal qui, une fois clivé, permet l'entrée des PCs dans la voie de sécrétion. Ce segment est suivi d'un **prosegment** qui est une prolongation en N-terminal de la protéine mature. Il contient environ 80 à 105 acides aminés qui sont éliminés dans le RE pour permettre l'activation partielle des convertases (à l'exception des prosegments de PC2 et de SKI-1, qui sont éliminés au niveau de la voie de sécrétion tardive). Cette région inhibe donc l'activité catalytique des PCs dans des compartiments précoces de la voie de sécrétion (Silen *et* Agard 1989 ; Zhu *et al*, 1989) et favorise également le repliement fonctionnel de la protéine. Par contre,

la présence du groupement des acides aminés basiques dans le prosegment et leurs modifications auto-catalytiques qu'impliquent le clivage du prosegment n'ont été bien élucidées que pour la furine (Leduc, 1992 ; Anderson *et al*, 1997). Cela suggère, que la voie d'activation de la furine pourrait représenter un modèle pour tous les PCs, à l'exception de PC2 et SKI-1. Dans ce modèle, la protéase, qui est synthétisée sous forme de précurseur, a besoin de son prodomaine en N-terminal pour se replier efficacement dans le RE. Suite à l'acquisition de cet état natif, le clivage autocatalytique du prodomaine aura lieu. Le propeptide clivé reste attaché à la furine et fonctionne comme un auto-inhibiteur puissant jusqu'au niveau du TGN. À l'intérieur de celui-ci où l'environnement est légèrement acide et la concentration du Ca^{+2} élevée, le propeptide de la furine est encore clivé de manière auto-catalytique. En effet, ce deuxième clivage libère le propeptide et conduit à l'activation complète de cette convertase (Molloy *et al*, 1999).

Le domaine catalytique des PCs présente la triade catalytique (D,H,S) et l'oxyanion (N; D pour PC2). L'activité enzymatique des PCs est régulée par la concentration en Ca^{+2} et la valeur du pH. Les conditions d'activité maximale varient selon les PCs. Il est possible que ces variations reflètent le milieu des compartiments cellulaires où l'activité des différentes convertases se manifeste (Nakayama, 1997). Le domaine catalytique représente la région la plus conservée avec environ 50% de similarité des séquences entre les PCs (Zhou *et al*, 1998). Cependant, la convertase PC2 partage moins de similitudes avec les autres PCs des mammifères (Martens *et al*, 1994 ; Benjannet *et al*, 1995a ; Benjannet *et al*, 1995b).

Le domaine P aussi appelé domaine homo B (Rouille *et al*, 1995 ; Seidah *et* Chrétien, 1994), est composé d'environ 150 acides aminés, et aurait un rôle régulateur. Ce domaine pourrait avoir un effet sur la dépendance au Ca^{2+} , effet qui est plus efficace à pH acide (Zhou *et al*, 1998). De plus, il contient une structure β -barrel qui interagirait avec le domaine catalytique et le stabiliserait (Kazuya *et al*, 2003). Le domaine P contient le motif conservé RRGDL (Arg-Arg-Gly-Asp-Leu), présent dans tous les PCs à l'exception de PC7 qui contient le motif RGS. La

mutation d'un seul résidu dans la séquence RGD de PC1 cause la dégradation de la convertase dans le RE (Lusson *et al*, 1997) ce qui indique que l'intégrité de cette séquence est essentielle au bon repliement des PCs. Cependant, ce motif n'est pas conservé chez les différentes espèces. Il est possible que le résidu serine de la séquence RGS de PC7, lorsqu'il est phosphorylé, puisse être substitué par l'acide aspartique chargé négativement (Seidah *et al*, 1996c).

Le domaine en C-terminal représente la région la moins conservée entre les PCs. Pour plusieurs PCs, cette région détermine le ciblage vers différents compartiments intracellulaires. En effet, la région C-terminale de la furine contient des séquences répétées qui joueraient un rôle dans sa localisation. Elle comprend des motifs qui induisent sa localisation au TGN, sa localisation à la membrane plasmique ainsi que son recyclage au TGN (Wan *et al*, 1998). De plus, la furine, PC5-B et PC7 présentent un segment transmembranaire (Molloy *et al*, 1994). La furine perd son ancrage transmembranaire pour finalement être libérée sous forme soluble dans l'espace extracellulaire. Cette région comporte des régions riches en cystéines dans la furine, PACE4A, PC5 et PC7. D'autre part, la présence des hélices α pour PC1 et PC2 servirait à leur ancrage aux membranes et à leur triage vers les SGs (Seidah *et al*, 1991a ; Smeekens *et Steiner*, 1992).

2.3 Les isoformes des PCs

Bien que toutes les PCs présentent des formes multiples d'ARNm (Seidah *et al*, 1994), des isoformes de protéines sont prédites seulement pour **PC4** (Seidah *et al*, 1992 ; Mbikay *et al*, 1994), **PACE4** (Mori *et al*, 1997 ; Kiefer *et al*, 1991) et **PC5** (Nakagawa *et al*, 1993 ; Lusson *et al*, 1993).

Les seules isoformes étudiées jusqu'à présent sont celles de PACE4 et de PC5. Le gène hPACE4 (Kiefer *et al*, 1991) est le plus grand gène de PCs rapporté et engendre plusieurs isoformes d'ARNm (Tsuji *et al*, 1997) : la forme PACE4-A qui possède la

longueur maximale, PACE4-B, PACE4-C, PACE4-D (Tsuji *et al*, 1994), PACE4-E (Mori *et al*, 1997) et PACE4-CS qui est une forme raccourcie de PACE4-C.

Les deux isoformes de PC5, produites par simple épissage alternatif (Nakagawa *et al*, 1993 ; Lusson *et al*, 1993), sont PC5-A qui est la forme soluble et PC5-B qui est la forme liée aux membranes. Une étude démontre que ces deux isoformes de PC5 sont triés vers des compartiments sub-cellulaires différents lorsqu'ils sont transfectés de manière transitoire dans les cellules AtT20 (cellules *Corticotrophic* de souris) (De Bie *et al*, 1996), clivant donc différents précurseurs. Ainsi, PC5-A est emmagasinée à l'intérieur de SGs de la voie de sécrétion régulée alors que PC5-B est retenue dans l'appareil de Golgi.

2.4 Les PCs de la voie de sécrétion régulée.

L'activité des différentes convertases est optimale à des concentrations de Ca^{2+} d'environ 10 mM et des valeurs de pH légèrement acide (pH=6), des conditions qui prévalent dans le TGN et les ISGs. Ces différences reflètent probablement le milieu des compartiments cellulaires dans lequel l'activité des différentes convertases se manifeste (Nakayama, 1997). Donc, certaines PCs semblent être actives au niveau du TGN (pH=6,0-6,5) et de la membrane plasmique alors que d'autres clivent des protéines au niveau de la voie de sécrétion tardive à l'intérieur des SGs (pH=5,5-6,0). Les convertases PC1, PC2 et PC5-A ont une activité enzymatique ciblée dans les granules de sécrétion de cellules neuroendocrines et endocrines. Elles font alors partie de la voie de sécrétion régulée (Figure 7). Différentes études ont démontré que ces protéases ont comme substrats plusieurs prohormones et proenzymes dans le microenvironnement des SGs, tels que la proinsuline, la POMC (pour proopiomélanocortine), le proglucagon, la prorénine, (Seidah *et al*, 1999; Zhou *et al*, 1999) (Figure 8). L'activité protéolytique limitée des enzymes retrouvées dans les organelles permet aux produits d'être emmagasinés à l'intérieur des SGs, puis libérés immédiatement après stimulation. L'emmagasinage ainsi que la production de

Figure 7 Localisation subcellulaire de PCs et SKI

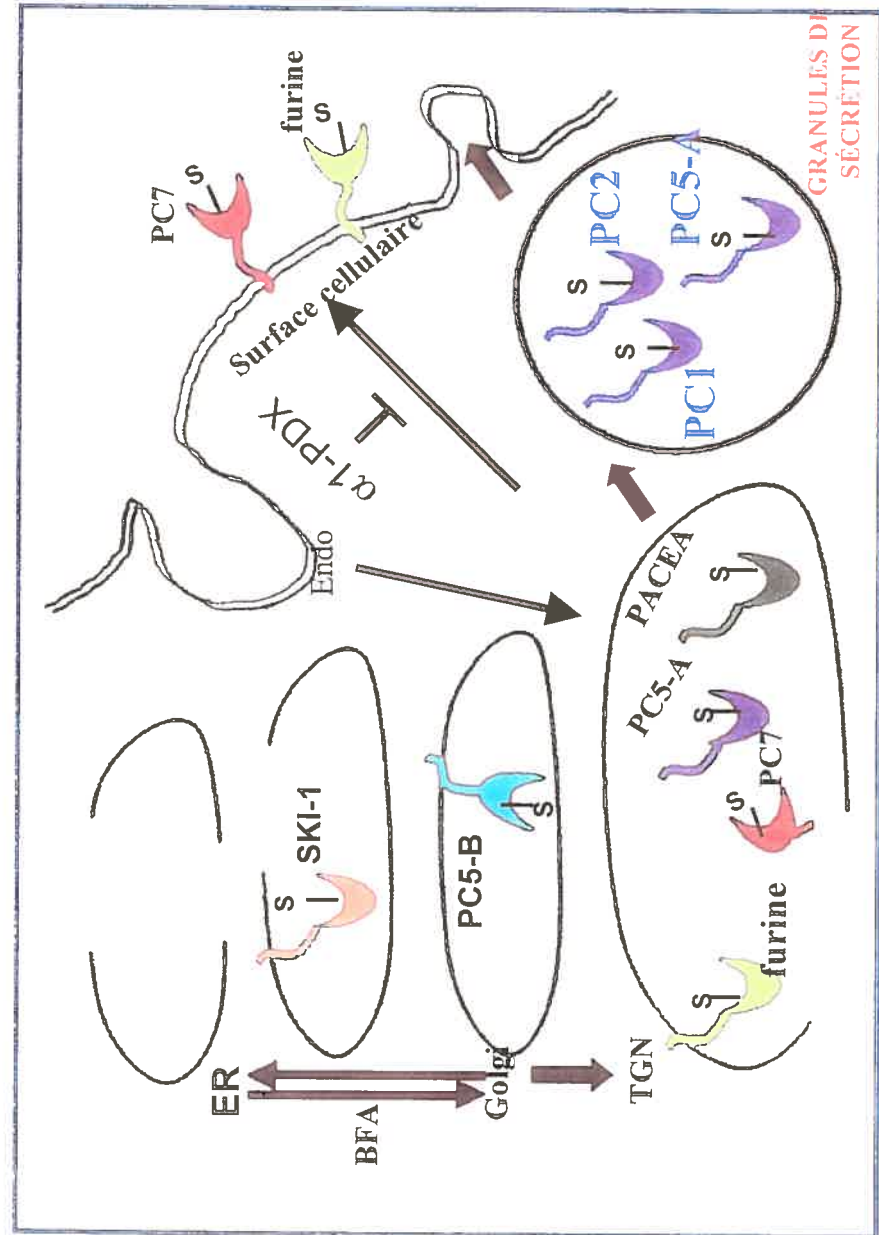
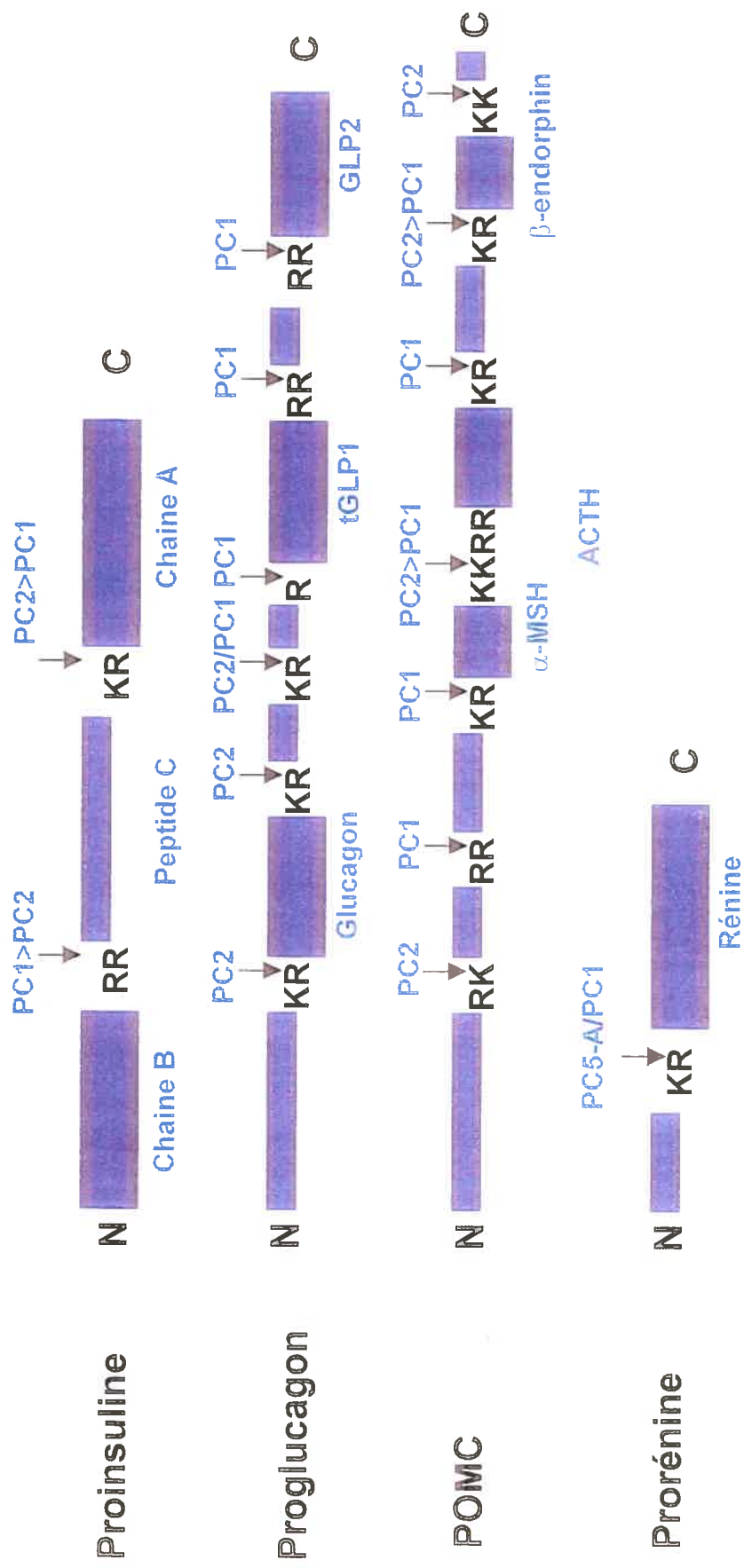


Figure 8 Quelques substrats traités par des proprotéines convertases de la voie de sécrétion régulée



protéines et de peptides actifs dans les SGs, nécessitent la co-ségrégation du substrat et de ces enzymes PCs à l'intérieur des granules de sécrétion immatures ISGs. De manière semblable, l'action de la protéase sur son substrat est inhibée jusqu'à ce que tous deux se retrouvent à l'intérieur des SGs. Les trois prochains paragraphes expliquent en détail la biosynthèse des proprotéines convertases de la voie de sécrétion régulée.

2.4.1 Biosynthèse de PC1/3

Probablement la meilleure proprotéine convertase étudiée et qui est ciblée vers les SGs est PC1/3. Après l'élimination du peptide signal dans le RE, le prosegment en N-terminal de PC1 est rapidement enlevé dans un compartiment pre-Golgien, probablement le RE par un mécanisme autocatalytique (Goodman *et al*, 1994). Comme dans la plupart de zymogènes, le prosegment de PC1 paraît être important pour le repliement correct de l'enzyme et son enlèvement active partiellement la proprotéase, ce qui résulte en la création d'une forme de 87 Kda de PC1. Contrairement à la plupart des membres de la famille de proprotéines convertase, PC1 subit un second clivage dans des cellules qui contiennent des SGs, où les 135 acides aminés en C-terminal sont enlevés. Ce clivage a lieu aux sites dibasiques Arg-Arg⁶¹⁷⁻⁶¹⁸ (Lindberg *et al*, 1995) probablement par un mécanisme autocatalytique (Lindberg *et al*, 1995 ; Lindberg et Zhou, 1994). Ceci amène à une forme de 66 kda de PC1. Cette dernière forme présente une activité protéolytique augmentée dans les compartiments des ISGs (Benjannet *et al*, 1993 ; Vindrola *et al*, 1992 ; Zhou *et al*, 1995), ce qui suggère que la queue en C-terminal de PC1 agisse ensemble avec son prosegment en N-terminal dans la régulation de l'activité enzymatique de PC1.

Récemment, il a été rapporté que la surexpression dans des cellules AtT20 d'une protéine appelée pro-SAAS, mène à l'inhibition du clivage de la POMC par la proprotéine convertase PC1 (Fricker *et al*, 2000). De plus, la distribution de pro-SAAS, généralement similaire à PC1 (Lindberg *et al*, 2001), conduit à la suggestion

que pro-SAAS pourrait servir comme un inhibiteur endogène de l'activité de PC1. Par contre, étant donné que pro-SAAS est également un substrat de PC1, son rôle physiologique dans l'inhibition de cette convertase est encore un sujet de débat. Particulièrement, une étude a démontré que le ciblage de PC1 à l'intérieur des SGs est effectué par des structures des hélices α prédites dans sa queue en C-terminal de PC1 (Jutras *et al*, 2000). Ce ciblage est également dépendant des interactions avec des composants spécifiques de la membrane des SGs (Jutras *et al*, 2000). Bien que ces propriétés paraissent être décisif dans le triage de PC1 vers les SGs, rien est connue au sujet de comment les hélices α dans la queue en C-terminal de PC1 promeut leur association aux membranes.

2.4.2 Biosynthèse de PC2 et de sa protéine de liaison 7B2

Toutes les PCs subissent un clivage autocatalytique du prosegment dans le RE, à l'exception de PC2 qui est l'unique convertase dont l'activation requiert des conditions acides (Lamango *et al*, 1999). Par conséquent, le clivage de PC2 a lieu à l'intérieur du TGN/ISG (Benjannet *et al*, 1993 ; Zhou *et Mains*, 1994). Une fois que PC2 est repliée dans le RE, elle se lierait de manière spécifique à une protéine nommée 7B2. La protéine 7B2 est une chaperone spécifique neuroendocrinienne qui s'associe de manière transitoire à la convertase PC2 (Braks *et Martens*, 1994) et est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif de 27kDa. De plus, elle serait clivée au site polybasique dans le TGN, probablement par une enzyme relié à la furine ou par la furine elle-même (Benjannet *et al*, 1995). Ce clivage donne naissance à une forme d'environ 21kDa en N-terminal (Ayoubi *et al*, 1990 ; Lazure *et al*, 1991 ; Paquet *et al*, 1994) et à un peptide d'environ 3,5kDa en C-terminal qui, plus tard, sera clivé pour générer un plus petit fragment (Paquet *et al*, 1991 ; Sigafos *et al*, 1993 ; Zhu *et al*, 1996). Ces clivages ont pour effet d'exposer le prosegment de la convertase PC2 en N-terminal. De plus, la forme de 21kDa de la protéine 7B2 est capable de stabiliser PC2 (Lamango *et al*, 1996). Il a été démontré que 7B2 contiendrait une hélice polyproline qui serait impliquée dans son interaction avec la pro-PC2 (Zhu *et*

al, 1996). En absence de 7B2, l'autoclivage de proPC2 donne naissance seulement à la forme inactive de l'enzyme (Zhu *et al*, 1995), ce qui suggère que 7B2 améliore l'efficacité de l'activation de PC2 (Braks *et al*, 1994 ; Benjannet *et al*, 1995a ; Benjannet *et al*, 1995b) et qu'elle serait nécessaire pour le transport de PC2 vers le TGN (Braks *et al*, 1999). Ensuite, PC2 est probablement clivée par un mécanisme autocatalytique intramoléculaire, mais ce clivage ne génère que la forme active de PC2 qu'en présence du fragment de 21kDa de 7B2 (Muller *et al*, 1997). Le domaine en C-terminal de 7B2, appelé CT peptide (pour *carboxy-terminal peptide*), inhibe l'activité de PC2 jusqu'au clivage de ce fragment par la CPE (*Carboxypeptidase E*) (Zhu *et al*, 1996).

2.4.3 Biosynthèse de PC5

PC5 représente une autre convertase, la moins étudiée de la voie de sécrétion régulée. PC5 joue également un rôle dans la maturation protéolytique d'une variété de propeptides chez les mammifères, puisque sa distribution est répandue.

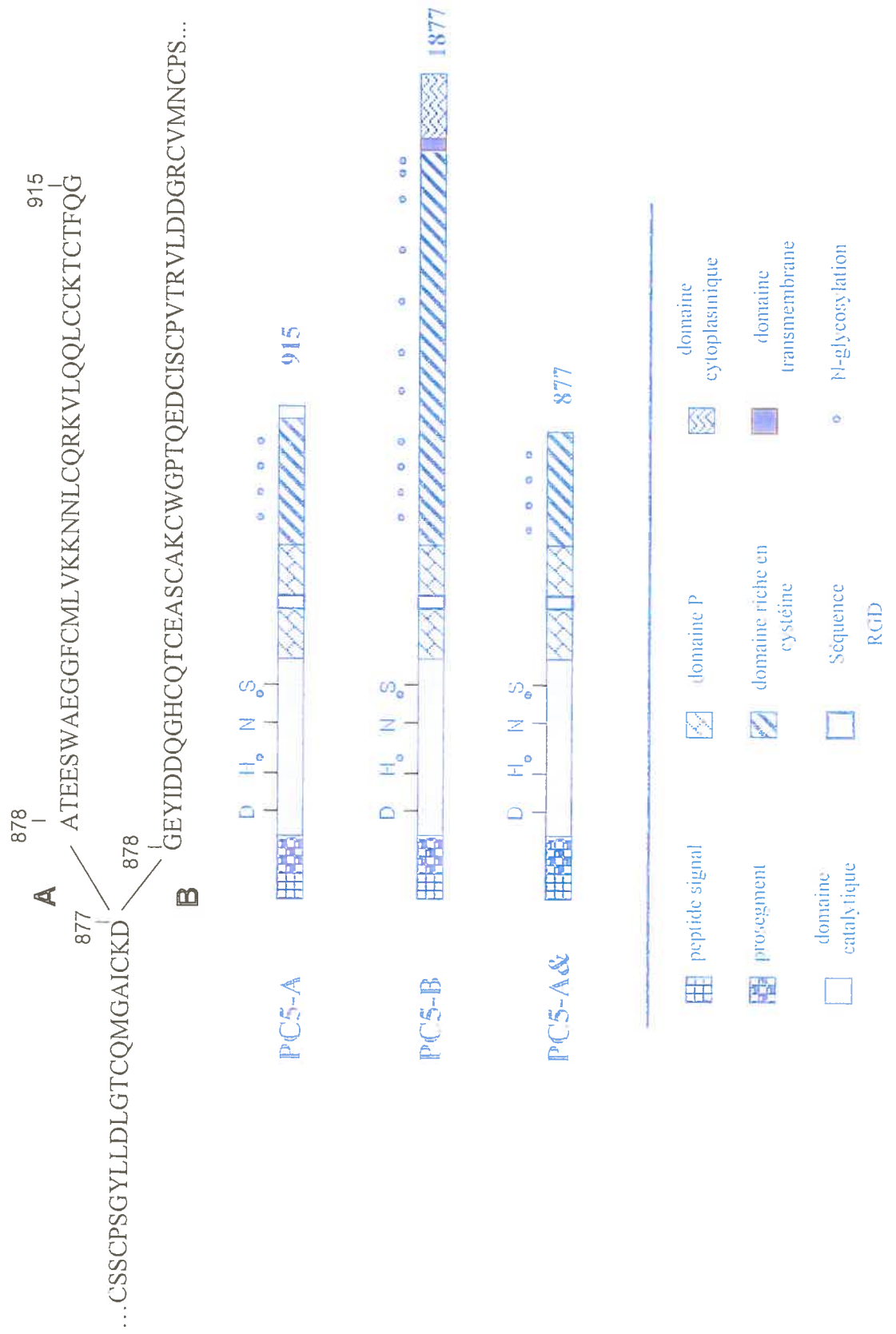
PC5 existe sous deux isoformes différentes : PC5-A et PC5-B, générées par épissage alternatif d'un précurseur commun (Mbikay *et al*, 1995 ; Nakagawa *et al*, 1993). Ces deux isoformes de PC5 sont triées vers des compartiments différents de la cellule, ce qui permet la maturation protéolytique des différents précurseurs. PC5-A est une isoforme soluble d'environ 915 acides aminés, ciblée vers les SGs (Nakagawa *et al*, 1993 ; Lusson *et al*, 1993 ; De Bie *et al*, 1996). PC5-B est une protéine longue de 1877 acides aminés, liée aux membranes qui circule entre le réseau-Golgien et la surface cellulaire (Nakagawa *et al*, 1993 ; De Bie *et al*, 1996 ; Xiang *et al*, 2000).

Une étude récente démontre que, contrairement à la furine (Nakayawa, 1997 ; Krysan *et al*, 1999), mPC5-A clive *in vitro* tri- et térapeptides aux sites monobasiques et aux paires d'acides aminés basiques (Cain *et al*, 2001). D'autre part, l'activation autocatalytique du pro-PC5 implique le clivage au site primaire KKRTKR¹¹⁶ trouvé en C-terminal du prosegment (De Bie *et al*, 1996). Ce clivage, comme pour toutes le

PCs sauf PC2, est fait au RE et est une condition pour la sortie de PC5 de ce compartiment sous-cellulaire (De Bie *et al*, 1996). Similaire aux subtilisines, (Shinde *et al*, 1993 ; Yabuta *et al*, 2001) à la furine (Anderson *et al*, 1997 ; Anderson *et al*, 2002) et au SKI-1 (Elagoz *et al*, 2000 ; Touze *et al*, 2000), le prosegment de PC5 resterait attaché de façon non-covalente à la forme active de l'enzyme et agirait comme un inhibiteur de la même manière qu'une chaperone intramoléculaire. À un pH faible et à une concentration de calcium élevée, probablement dans le TGN, le prodomaine se dissocierait et serait clivé au site secondaire interne HSRTIKR⁸⁴ ↓, trouvé à une position similaire à la furine (Seidah *et al*, 1998). Des études de mutagenèse dirigée ont démontré que le clivage en C-terminal des Arg¹¹⁶ et Arg⁸⁴ est essentiel et nécessaire pour l'activité enzymatique de PC5-A. En effet, une substitution en alanine de ces deux acides aminés mène à une enzyme incapable de cliver le substrat pro-VEGF-C (pour facteur C de croissance endothéliale pro-vasculaire) (Nour *et al*, 2003).

De plus, le C-terminal de PC5-A, contient un signal de triage de 38 acides aminés. Une délétion de la région en C-terminal de PC5-A (PC5-A Δ38) conduit à la perturbation de la distribution sub-cellulaire de PC5-A. En effet, la surexpression de la forme tronquée de PC5-A (PC5-A Δ38) dans des cellules AtT20 conduit au confinement de cette protéine convertase à la région golgienne, alors que la forme normale se retrouve dans les SGs. De plus, PC5-A Δ38 n'augmente pas en présence d'AMPC, ce qui confirmerait que la protéine tronquée ne parvient pas aux SGs dans des cellules transfectées (De Bie *et al*, 1996). Par ailleurs, l'isoforme long de PC5, la convertase PC5-B, présente un domaine luminal riche en cystéines en C-terminal et un domaine transmembranaire (TDM). Ce domaine transmembranaire, absent dans PC5-A (Nakagawa *et al*, 1993), retient PC5-B au niveau de l'appareil de Golgi. PC5-A est présente dans des tissus non-endocriniens et endocriniens. Elle est également particulièrement abondante dans l'intestin et la glande surrénale. PC5-B est par contre, détectée seulement dans l'intestin, la glande surrénale ainsi que dans les poumons (Lusson *et al*, 1993 ; Nakagawa, 1993 ; Seidah *et al*, 1994). La Figure 9 montre les isoformes de PC5 ainsi que le mutant représenté par PC5-A &

Figure 2 Représentation des isoformes des Proprotéines Convertases PC5-A/PC5-B et du mutant PC5-A&



3. Deux modèles pour le tri des protéines vers les SGs.

Les signaux qui ciblent les protéines vers les granules de sécrétion ne sont pas encore élucidés. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le ciblage des protéines vers les granules. Ces modèles sont regroupés en deux catégories selon leur point de triage vers les SGs : le TGN et les ISGs (Arvan *et al*, 1998 ; Thiele *et al*, 1997).

3.1 Modèle de tri par entrée

Étant donné que le TGN est le principal point d'embranchement du transport vésiculaire (Griffiths *et al*, 1996), ce modèle présume que le TGN serait l'opérateur primaire pour le tri des protéines vers les voies de transport biosynthétiques. Ce modèle suppose la présence d'un ou de plusieurs récepteurs de tri associés au TGN qui se lieraient aux protéines RSPs (*Regulated Secretory Proteins*) et les entraîneraient à l'intérieur des ISGs (*Immatures Secretory Granules*) (Kelly R, 1991 ; Tooze *et Stinchcombe*, 1992). Donc, cet événement serait semblable au récepteur mannose 6 phosphate pour les lysosomes. Des études récentes suggèrent que les RSPs deviendraient spécifiquement liées aux récepteurs dans les ISGs ou à d'autres RSPs qui sont déjà liées aux récepteurs (Arvan *et Castle*, 1998). Il a été proposé que dans le TGN, ces RSPs forment des agrégats insolubles (Chanat *et Huttner*, 1991) qui empêchent l'entrée des protéines vers la voie de sécrétion constitutive (Bauerfeind *et Huttner*, 1993). Une importante caractéristique de ce modèle est l'apparente fonction de "contrôleur" où seules les protéines de sécrétion, séparées ou en agrégats, soient autorisées à passer la porte d'entrée vers les ISGs, alors que les autres protéines sont exclues (Thiele *et al*, 1997). Selon ce modèle, les protéines qui n'interagissent pas avec les récepteurs ou les protéines agrégées ou liées

aux membranes des ISGs, pourraient suivre la voie par défaut, c'est-à-dire la voie constitutive (Moore *et al*, 1989 ; Tooze *et Stinchcombe*, 1992 ; Thiele *et al*, 1997 ; Kelly R, 1985). Ce modèle est donc une entrée sélective des protéines dans la voie de sécrétion régulée.

Une première indication en faveur de la fonction de récepteur dans le modèle de tri par entrée fut la découverte d'une protéine de 35kDa (Chung *et al*, 1989). Cependant, après maintes recherches, cette protéine s'est avérée être la chymotrypsine. Un deuxième indice suggère que ce récepteur soit la carboxypeptidase E (CPE) (Cool *et al*, 1997), une enzyme de maturation qui pourrait favoriser l'entrée des protéines dans les ISGs (*Immatures Secretory Granules*). En effet, chez des souris Cpe^{fat}/Cpe^{fat} déficientes en CPE (Naggert *et al*, 1995), une étude démontre une augmentation de la sécrétion constitutive des précurseurs hormonaux comme la POMC (Shen *et Loh*, 1997). En revanche, une autre étude a démontré chez ces mêmes souris Cpe^{fat}/Cpe^{fat} , que l'entrée de la proinsuline à l'intérieur de ISGs ne semble pas être altérée, quoique la maturation de l'insuline soit incomplète (Irmiger *et al*, 1997 ; Varlamov *et al*, 1997). De plus, une troisième étude indique que la co-agrégation de la CPE avec plusieurs précurseurs hormonaux pourrait indiquer un rôle de la CPE dans ce processus. Ceci pourrait expliquer la condensation incomplète de la proinsuline dans les SGs des souris Cpe^{fat}/Cpe^{fat} (Naggert *et al*, 1995; Rindler, 1998). En conclusion, la CPE est essentielle à la maturation des précurseurs, mais n'est probablement pas nécessaire pour leur ciblage dans la voie de sécrétion régulée.

3.2 Modèle de tri par rétention

Ce modèle prend en considération le fait que les ISGs (*Immatures Secretory Granules*) soient une importante station de triage post-Golgien. En effet, les ISGs agissent comme une extension fonctionnelle du TGN et adoptent certains mécanismes de triage. Les ISGs seraient le site de sélection des protéines. Plus tard, ces protéines seraient emmagasinées ou non à l'intérieur des MSGs (*Matures Secretory Granules*)

(Arvan *et* Castle, 1992). Les protéines luminales de l'appareil de Golgi (directement ou indirectement associées avec la membrane limitante) pourraient être disponibles et se joindre à la circulation vésiculaire des différentes voies dérivées du TGN. Le triage serait probablement un phénomène passif, compatible avec l'enlèvement des ISGs d'un sous-ensemble des composantes protéiques dans la sortie des vésicules. Trois événements caractérisent ce modèle :

- L'entrée des protéines à l'intérieur des ISGs se fait par la formation d'un complexe insoluble. Donc, la liaison directe ou indirecte à la membrane des SGs ou au récepteur, n'est pas exclusive pour l'entrée des protéines.
- Des associations intermoléculaires induisent une rétention efficace de RSPs (*Regulated Secretory Granules*) à l'intérieur des MSGs (*Matures Secretory Granules*).
- Une voie de sortie enlève activement certains ligands, incluant les proenzymes lysosomales ainsi qu'une partie des protéines de sécrétion

Ce modèle propose une rétention sélective des protéines dans la voie de sécrétion régulée.

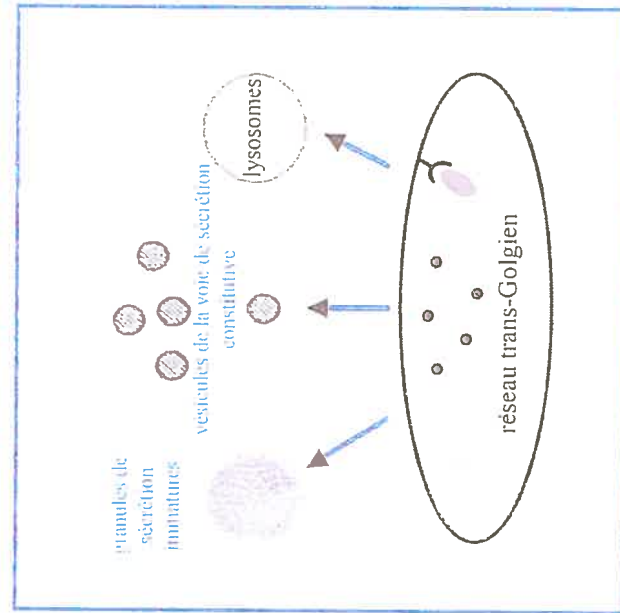
La figure 10 montre une représentation des deux modèles de triage des protéines vers les granules de sécrétion.

3.2.1 Le processus de rétention : condensation

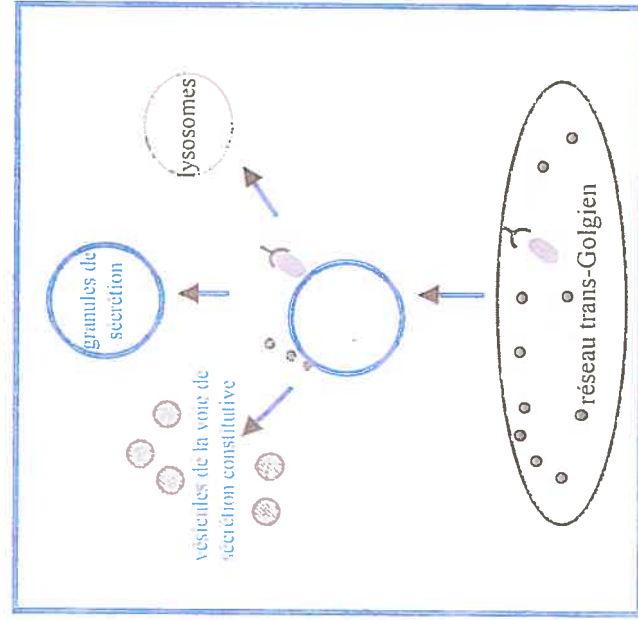
Le triage par rétention implique la réunion des protéines à l'intérieur des ISGs. Ce regroupement est favorisé par des changements dans l'environnement ionique des ISGs. Cet environnement est caractérisé par une faible acidification en présence d'une concentration élevée de Ca^{+2} et de zinc (Huang *et* Arvan 1995). De plus, les interactions entre les protéines amènent à l'insolubilité progressive dans l'environnement des MSGs (*Matures Secretory Granules*). C'est alors que la condensation des RSPs (*Regulated Secretory Proteins*) limiterait la capacité de ces

Figure 10. Représentation schématique des deux hypothèses du triage de protéines vers les granules de sécrétion matures

Tri par entrée



Tri par rétention



molécules à sortir des vésicules de sécrétion pendant le processus de bourgeonnement. D'autre part, des manipulations perturbant l'environnement et favorisant les interactions intermoléculaires des RSPs conduisent à la perte de l'augmentation des protéines à l'intérieur des granules (vonZastrow *et al*, 1989) et la détérioration de la condensation intra-granulaire (Kuliawatt *et Arvan*, 1994).

4. Plusieurs mécanismes de triage des protéines vers les SGs

Il est évident que la rétention des protéines à l'intérieur des SGs ne se fait pas au hasard. En effet, les protéines doivent posséder des propriétés uniques et interagir avec d'autres composantes. Dans les cellules AtT20, l'insuline humaine pourrait être correctement triée vers les SGs denses (Moore *et al*, 1983). Cette étude démontre, pour la première fois, que le processus de triage est principalement déterminé par des signaux contenus à l'intérieur de la protéine ciblée. Cette découverte a permis d'identifier des signaux de triage dans des cellules AtT20 transfectées et dans d'autres types cellulaires en utilisant l'expression des formes mutantes. Jusqu'à aujourd'hui, aucun signal de triage n'a été défini avec certitude malgré la recherche intensive. Cependant, plusieurs mécanismes semblent pouvoir expliquer le mécanisme de triage de protéines vers les SGs. En voici quelques-uns :

4.1 L'Agrégation

Le contenu des granules de sécrétion (SGs) est fortement concentré. En effet, la taille et la densité des granules peuvent varier en fonction de leur contenu. Dans l'hypophyse, il est possible de faire une distinction, basée sur l'apparence des granules, entre les sommatotrophes contenant l'hormone de croissance, les lactotrophes contenant la prolactine et les corticotrophes contenant l'ACTH (pour Hormone Adrenocorticotrophique). Cela suggère que les protéines triées joueraient un rôle important dans la détermination de l'apparence de la matrice des granules de

sécrétion. Plusieurs protéines triées vers les SGs telles que l'hormone de croissance, la prolactine et l'ANF (pour Facteur atrial natriurétique) montrent une tendance à s'agréger dans un environnement légèrement acide et riche en cations. Un tel environnement est retrouvé dans le réseau trans-Golgien ainsi que dans les ISGs (*Immatures Secretory Granules*) (Lee *et al*, 2001 ; Canaff *et al*, 1996). Un lien entre la capacité de s'agréger *in vitro* et d'être trié vers les granules de sécrétion, dans des cellules transfectées, a été établi par des études effectuées sur la CGA (Cowley *et al*, 2000) et l'ANF (facteur atrial natriurétique) (Canaff *et al*, 1996). D'autre part, la proinsuline, la POMC et d'autres protéines de fusion, contenant la queue C-terminal de PC1, formeraient aussi des multimères. Toutefois, cette propriété ne semble pas être suffisante pour le triage vers les granules de sécrétion (Jutras *et al*, 2000 ; Cawley *et al*, 2000 ; Quinn *et al*, 2000). Par conséquent, il est difficile d'envisager que l'agrégation puisse être suffisante pour fournir le signal de ciblage spécifique des protéines vers cette organelle. Il est plus probable que l'agrégation augmente l'efficacité de rétention des protéines dans les granules de sécrétion.

4.2 Le Clivage par les Proprotéines Convertases

La matrice de certains ISGs (*Immatures Secretory Granules*), contenant des protéines qui sont clivées par les convertases PC1 et PC2 (comme l'insuline ou la rénine), a une apparence para-crystalline. Cela suggère la présence d'une structure fortement organisée et répétée (Orci *et al*, 1986 ; Taugner *et al*, 1988). En effet, la protéolyse de ces substrats est un événement qui a lieu après le ciblage vers les granules de sécrétion (Taugner *et al*, 1986 ; Taugner *et* Hackenthal, 1988). Par ailleurs, la structure para-crystalline disparaît simultanément avec cette protéolyse. Cela suggère la possibilité que cette structure soit formée par une protéine d'échafaudage entre le substrat et l'enzyme (proprotéine convertase de la voie de sécrétion régulée).

Des membranes d'ancrage ont été placées en C-terminal de PC1 et PC2 afin de savoir si un complexe entre la convertase PC1/PC2 et son substrat est impliqué dans le triage du substrat vers les granules. Ceci provoque un réacheminement de ces deux

convertases vers les empilements de Golgi ainsi que la sécrétion constitutive des produits de la POMC (Bruzzaniti *et al*, 1999). D'autres études sur le ciblage et le processus de la prorénine en cellules AtT20 confirment le rôle de PC1 dans le ciblage vers les granules. D'abord, la prorénine humaine peut uniquement être clivée par PC1 dans des cellules qui contiennent des SGs (Benjannet *et al*, 1992). Cela suppose que la prorénine voyagerait avec PC1, à travers la voie de sécrétion précoce, sans être clivée. En second lieu, le ciblage de la prorénine vers les SGs dans des cellules transfectées AtT20 est dépendant de l'intégrité de l'unique site de clivage de PC1 dans la prorénine (Brechler *et al*, 1996). Cela suggère que, même si PC1 ne clive pas la prorénine dans des compartiments précoces de la voie de sécrétion, son interaction avec le site de clivage jouerait un rôle dans le triage. Des résultats semblables ont été rapportés pour la somatostatine (Brakch *et al*, 1994), l'insuline (Kuliawat *et al*, 2000) et pour les protéines de fusion non-naturelles (Brechler *et al*, 1996). Par ailleurs, une modification du site de clivage de PC1 dans la prorénine par le site de clivage de la furine, empêche l'entrée de la prorénine à l'intérieur de SGs et conduit à la sécrétion constitutive de la rénine active. Ces résultats nous amènent à la conclusion que l'interaction de la prorénine avec PC1 est importante pour le triage de la prorénine vers les SGs et pas pour le clivage.

Une étude a récemment démontré que la queue C-terminale de PC1 limite son activité protéolytique envers la prorénine avant d'entrer dans des ISGs (*Immatures Secretory Granules*). La présence d'une hélice α dans cette région serait nécessaire pour son entrée dans ce compartiment cellulaire (Jutras *et al*, 2000). Alors, PC1 formerait probablement un complexe semi-stable avec le site de clivage de son substrat dans des compartiments précoces de la voie de sécrétion et entraînerait le substrat vers les SGs où le clivage aura lieu.

4.3 La liaison à d'autres enzymes de modification.

Le modèle antérieur est fondamentalement une variante d'un modèle dans lequel la protéine est traînée à l'intérieur des granules par une association transitoire avec une enzyme (enzyme de modification ancrée aux granules). Concernant l'importance de la CPE dans le triage vers les SGs, une étude suggère que comme PC1, CPE se lierait aux membranes par l'intermédiaire d'une hélice α , présente dans sa queue en C-terminal (Varlamov *et al*, 1996), quoique ce domaine de triage eut été rapporté différent de celui de PC1. Ce modèle de ciblage par association est soutenu par des expériences dans lesquelles un anticorps pour la CGB (*Chromogranin B*) est trié vers les granules lorsqu'il est injecté dans des cellules exprimant la CGB. Par contre, des anticorps non reliés à la CGB sont sécrétés de manière constitutive (Weiss *et al*, 1989). Cela augmente la possibilité que d'autres protéines comme PAM (*Peptidylglycine α -Amidating Monooxygenase*), qui se joignent et finissent à l'intérieur des granules, puissent ancrer leurs substrats aux ISGs (*Immatures Secretory Granules*) par encapsulation. Toutefois, il est difficile de déterminer la contribution de PAM dans le triage des protéines, étant donné qu'il amide le résidu glycine situé en C-terminal de la protéine, après le clivage par des PCs et après l'enlèvement des acides aminés par la CPE, lesquels pourraient aussi contribuer au triage.

4.4 La boucle en N-terminal

Quelques protéines destinées aux granules de sécrétion comme la POMC, la CGA (*Chromogranin A*) et la CGB (*Chromogranin B*), présentent une boucle en N-terminal limitée par un pont disulfure. Cette structure est impliquée dans l'homodimérisation (Cawley *et al*, 2000 ; Glombik *et al*, 1999), la liaison aux membranes (Glombik *et al*, 1999) et le triage de protéines hétérologues vers les granules de sécrétion (Glombik *et al*, 1999 ; Tam *et al*, 1993). Jusqu'à présent, la contribution de ces boucles dans le triage n'est pas encore élucidée. Il a été rapporté

que la boucle en N-terminal de la POMC lierait la CPE, tandis que celles des chromogranines ne le feraient pas (Cool *et al*, 1998). Le traitement des cellules avec le dithiotreitol, lequel pourrait perturber la structure en boucle du N-terminal, empêche le triage de la CGB vers les SGs dans les cellules PC12, mais pas dans les cellules GH4 (Gorr *et al*, 1999). D'autre part, le C-terminal de la CGA qui sert d'intermédiaire pour l'agrégation, est nécessaire pour le triage vers les SGs dans des cellules GH4, mais ne semble pas être nécessaire dans les cellules PC12 (Cowley *et al*, 2000). Alors il existe probablement des mécanismes de triage distincts entre ces deux types cellulaires. Ces études pourraient également montrer les différentes sensibilités de ces deux types cellulaires aux agents réducteurs, la présence de différents partenaires de liaisons dans les ISGs et d'autres phénomènes qui ne sont pas directement reliés aux mécanismes de ciblage des protéines.

4.5 L'association aux lipides

Des études récentes suggèrent qu'il existe une séquestration de certains lipides et protéines à l'intérieur de domaines très distincts des différentes membranes de la cellule. Ces domaines sont nommés "rafts" ou DRM (pour *Detergent-Resistant Membranes*), étant donné qu'ils peuvent être fractionnés à partir de préparations cellulaires de mammifères. Ce fractionnement est effectué par extraction en utilisant des détergents non-ioniques. Les DRMs sont riches en cholestérol et en sphingolipides et sont probablement formés par un domaine liquide hautement ordonné à l'intérieur de la bicouche lipidique. Il a été démontré que certaines protéines de surface sont riches en DRMs (Melkonian *et al*, 1999). Ces lipides "rafts" pourraient donc être impliqués dans le ciblage de protéines vers les SGs. En effet, une étude démontre qu'une diminution du contenu en cholestérol dans des cellules AtT20 traitées avec la lovastatine, inhibe le ciblage de la POMC et de la CGB vers les granules (Wang *et al*, 2000). Le ciblage de PC2 vers les SGs est empêché lorsque les cellules AtT20 sont traitées avec la fumonisine, une drogue qui diminue la quantité des sphingolipides (Blazquez *et al*, 2000). De plus, le contenu de SGs dans les

cellules GH4 augmenterait significativement lorsqu'il est enrichi de cholestérol (Wang *et al*, 2000). La synaptophysine possède l'aptitude de se lier au cholestérol et cette association semble être cruciale pour la formation des vésicules synaptiques (Thiele *et al*, 2000).

Toutes ces données nous montrent l'importance des domaines des membranes riches en cholestérol et en sphingolipides dans le triage et l'ancrage de protéines aux ISGs (*Immatures Secretory Granules*). De plus, la structure d'hélice α dans la queue C-terminale de PC1, laquelle est essentielle pour le triage de PC1 vers les SGs, s'associe à des fractions de membranes. Cela a été démontré en utilisant des agents réticulants (Jutras *et al*, 2000). De plus, des mutations à l'intérieur de cette structure en hélice α , empêchent le ciblage de PC1 vers les SGs ainsi que sa ségrégation à l'intérieur de fractions de membranes. Ce résultat augmente la possibilité que PC1 doit s'associer aux composantes lipidiques pour entrer à l'intérieur des SGs. La nature des interactions des enzymes PCs à l'intérieur des membranes des SGs et l'identité des lipides impliqués restent inconnus.

5. Hypothèse de travail

La convertase PC5-A présente plusieurs caractéristiques similaires à celles de la convertase PC1. Ces caractéristiques impliquent : la perte de son domaine en C-terminal dans les cellules endocrines, le clivage de son prosegment en N-terminal très tôt dans la voie de sécrétion et la présence d'un domaine de ciblage dans son domaine C-terminal. De plus, des résultats précédents dans notre laboratoire suggèrent qu'il existe un domaine de triage en C-terminal de PC5-A qui la cible vers les SGs. Ce domaine présente une prédiction d'hélice α selon l'algorithme de Garnier-Osguthorpe-Robson. La possibilité que le domaine en C-terminal de PC5-A, qui le cible vers les granules de sécrétion, soit semblable à celui de PC1 ou au domaine de triage non caractérisé de PC2, nous a amené à proposer une hypothèse.

Hypothèse: Une hélice α est responsable du triage de la convertase PC5-A vers la voie de sécrétion régulée.

Nous proposons donc un modèle dans lequel le substrat formerait un complexe semi-stable avec la proprotéine convertase de la voie de sécrétion régulée, PC5-A. Dans le RE, le prosegment de la proprotéine convertase serait clivé et ensuite détaché probablement au niveau du RE ou de l'appareil de Golgi. Dans le réseau trans-Golgien, la proprotéine convertase se lierait à son substrat, mais le clivage serait inhibé par la présence de la queue en C-terminal de PC5-A. La région en C-terminal serait dépliée et s'associerait à d'autres régions en C-terminal de la convertase ainsi qu'aux membranes des granules de sécrétion. Dans les granules de sécrétion matures, le C-terminal de PC5A serait clivé, ce qui permettrait la libération de l'enzyme active ainsi que le clivage de la proprotéine.

Des prédictions des hélices α par des algorithmes de Garnier-Osguthorpe-Robson et Chou Fasman sont présentes dans la Figure 11. Un résumé du modèle proposé est également présenté à la Figure 12.

FIGURE 11. Prédiction des hélices α par des algorithmes de Garnier-Osguthorpe-Robson (lignes solides) et de Chou Fasman (lignes discontinues) dans le région en C-terminal de PC1, de PC2 et de PC5-A

C-terminal de PC1 de souris

IPYESFYEALEKLNKPSKLEGSEDSLYSDYVDVFYNTKPYKHRDDRLQALMDILNEEN
 695 753

C-terminal de PC5-A de souris

DLGTCQMGAICKDATEESWAEGGFCMLVKNNLCQQRKRVLQQLCCKTCTFQG
 831 881

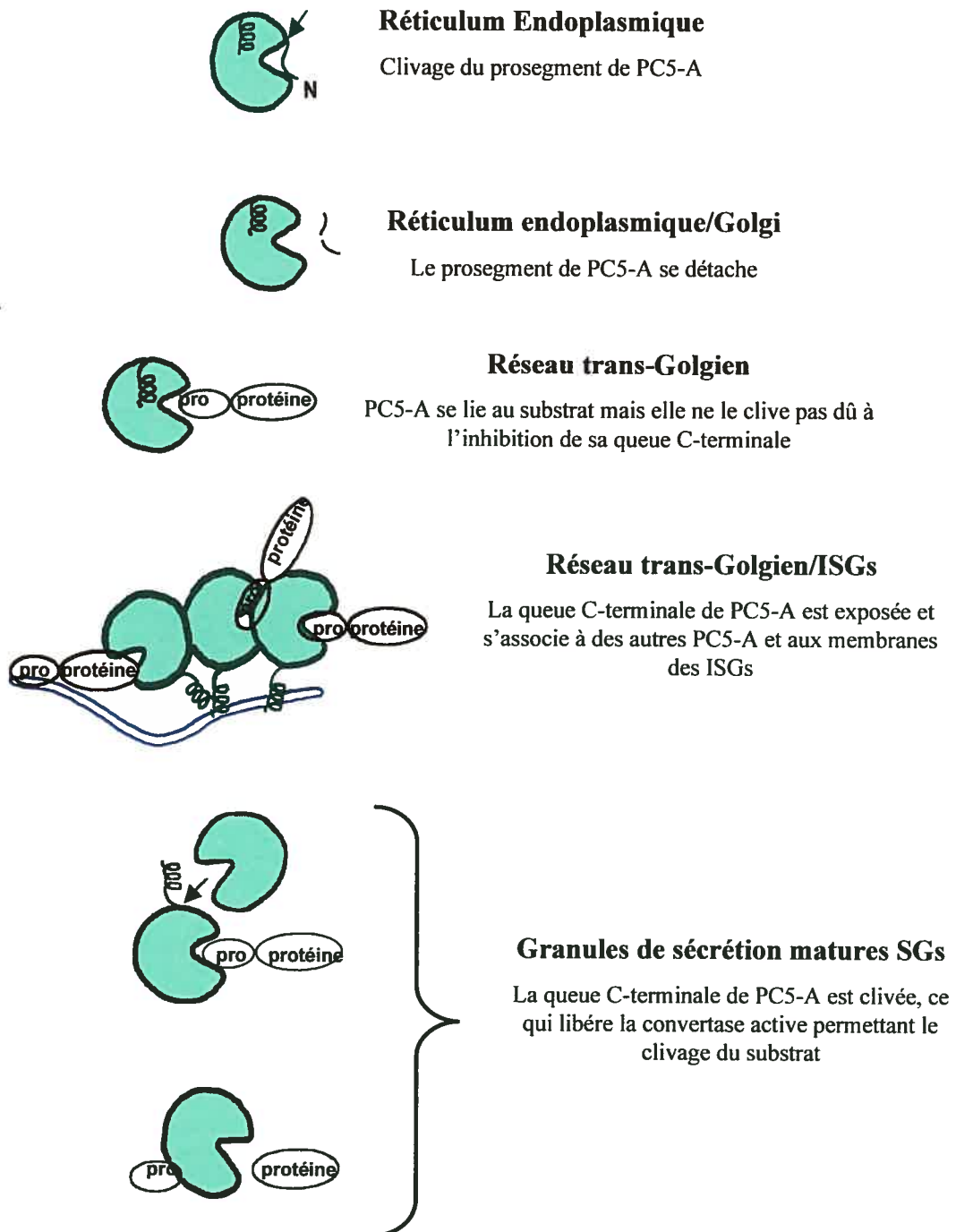
C-terminal de PC2 de souris

LMLHGTQSAPYIDQVVRDYQSKLAMSKKQEEELDEAVERSLQSLRKN
 588 637

Garnier-Osguthorpe-Robson _____

Chou Fasman -----

Figure 12. Modèle de triage de PCs, avec leurs substrats, vers les granules de sécrétion



CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1. Matériel

- Les enzymes de restriction Bgl II, Hind III, Xba I, BamH I, Pvu I proviennent d'Amershan Pharmacia, Oakville, ON.
- Les oligos proviennent de BioCorp. Montréal, Qc.CA.
- Acetate de potassium Fisher Scientific Limited, Ottawa, ON.
- Acide acétique glacial Anachemia Canada Inc, Montréal, QC.
- Acrylamine Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.
- Agarose low melting °T BMA, Rockland, ME USA.
- Agarose LE Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN.
- Ampiciline (Amp) Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN.
- β -mercaptoéthanol Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON.
- Ferrocyanure de K Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON.
- Ferricyanure de K Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON.
- Formaldéhyde BDH Chemicals Ltée. Toronto, ON.
- Bromophenol blue Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
- Bromure d'etidium Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON.
- Bis-acrylamine Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.
- Chlorure de calcium (CaCl_2) BDH Chemicals Ltée. Toronto, ON.
- Chlorure de magnésium
(MgCl_2) Fisher Scientific Limited, Ottawa, ON.
- Chlorure de potassium (KCl) BDH Chemicals Ltée. Toronto, ON.
- Chlorure de sodium (NaCl) Anachemia Canada Inc, Montréal, QC.
- Deoxycholate Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON.
- Dimethylformamide Anachemia Canada Inc, Montréal, QC.
- DMEM Incorporating Life Technologies, Burlington, ON.
- DMEM (sans glutamine) Incorporating Life Technologies, Burlington, ON.
- DMSO Anachemia Canada Inc. Montréal, CA.
- DNA ligase USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA.
- EDTA Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.

• Effectene	Qiagen Inc. Mississauga. ON.
• Éthanol	Anachemia Canada Inc. Montréal, CA.
• Forskoline	Sigma-Aldrich Canada Ltd. Oakville, ON.
• Formaldéhyde	Anachemia Canada Inc. Montréal, CA.
• Gentamycine	Incorporating Life Technologies, Burlington, ON.
• Kit de Plasmide Maxi	Qiagen Inc. Mississauga. ON.
• Kit de Purification (GFX PCR DNA and Gel Band)	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, QC.
• Glycérol	Sigma-Aldrich Canada Ltd. Oakville, ON.
• Glucose	Fisher Scientific Limited, Ottawa, ON.
• Glutamine	Incorporating Life Technologies, Burlington, ON.
• Glutaraldéhyde	Mecalab Ltd. Montréal, QC.
• Hydroxyde de sodium (NaOH)	BDH Chemicals Ltée. Toronto, ON.
• Hydroxyde de potassium (KOH)	Fisher Scientific Limited, Ottawa, ON.
• Inhibiteurs de Protéase	Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN.
• Isopropanol	Sigma-Aldrich Canada Ltd. Oakville, ON.
• L-méthionine	Sigma-Aldrich Canada Ltd. Oakville, ON.
• Marqueur SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.
• Marqueur 100pb	Incorporating Life Technologies, Burlington, ON.
• Marqueur 1 Kb	Incorporating Life Technologies, Burlington, ON.
• Membrane de dialyse	Spectrum Laboratories, Inc. California, USA.
• Méthanol	Anachemia Canada Inc. Montréal, CA.
• Méthionine L-[³⁵ S]	Perkin Elmer Life Sciences. Boston, MA.
• Nonidet P40	Sigma-Aldrich Canada Ltd. Oakville, ON.
• Persulfate d'Ammonium	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.
• Phénol Chloroforme	Incorporating Life Technologies, Burlington, ON.
• Phosphatase alcaline	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, QC.
• PPO	Sigma-Aldrich Canada Ltd. Oakville, ON.
• Protéine A sépharose	Sigma-Aldrich Canada Ltd. Oakville, ON.
• RNase A	Incorporating Life Technologies, Burlington, ON.
• Sodium dodécyl sulfate	Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN, USA.
• SerXtend	Irvine Scientific, Santa Ana, CA.
• Sérum de veau fœtal	Bio Media Canada, Inc. Drummonville, QC.

• Sérum de veau foetal (dialysé)	Incorporating Life Technologies, Burlington, ON.
• Tétracycline	USB Corporation, Cleveland, Ohio. USA.
• Temed	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.
• Tricine	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.
• Trypsine-EDTA	Incorporating Life Technologies, Burlington, ON.
• Tris	Incorporating Life Technologies, Burlington, ON.
• X Gal	Incorporating Life Technologies, Burlington, ON.

1.1 Solutions et tampons utilisés pour l'électrophorèse Schägger

Gel 3,0 M Tris
 0,3% SDS (pH=8,45) (avec HCl)

Anodo 0,2 M Tris (pH=8,9) (avec HCl)

Catodo 0,1 M Tris
 0,1 M Tricine
 0,1% SDS (pH=8,25)

Sample buffer 1 mL de Glycérol
 3 mL SDS 10%
 1,5 mL Tris 0,5 M (pH=6,8)
 0,5 mL H₂O
 = 6,0 mL
 + 120 µL β-mercaptoéthanol (20 µL / mL)

Maintenir à -20°C.

Acrylamine / bis-Acrylamine 49,5% T, 3% C

48 % Acrylamine

1,5 % bis-acrylamide

Maintenir à 4°C.

Running Gel 10% Acrylamide

Acrylamine (49,5%, 3%C)	3,05 mL
Tampon gel	5,0 mL
Glycérol	4,0 mL
H ₂ O	2,15 ml.
Persulfate d'Ammonium	75 µL
Temed	7,5 µL

Stacking Gel 4% Acrylamide

Acrylamine (49,5% et 3%C)	1,0 mL
Tampon gel	3,1 mL
H ₂ O	7,7 mL
Persulfate d'Ammonium	62 µL
Temed	6,2 µL

1.2 Solutions utilisées pour la coloration X-Gal**Fixateur**

1% formaldéhyde (solution saturée 37%)

0,2% glutaraldéhyde 70%

97 mL de PBS

Maintenir à la température ambiante.

Coloration X-Gal

5 mM Ferrycyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$

5 mM Ferrocyanure de potassium $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$

2mM de $MgCl_2$

X-Gal (1 mg/mL de diméthylformamide)

0,01% de NaDOC

0,02% de NP40

Disoudre tous dans du tampon PBS 1X.

2. Méthodes**2.1 Biologie moléculaire****2.1.1 Réaction en chaîne à la polymérase (PCR)**

Pour construire les plasmides recombinants, l'ADN cible qui est une partie de la queue de mPC5-A (insert), a été amplifié *in vitro* par la réaction en chaîne à la polymérase (PCR). 100 ng d'ADN cible ont été mélangés avec 100 ng de chacune des amorces (sens et antisens), dNTPs (25mM de chaque dNTPs), 5µL de tampon PCR (10X) (100mM tris-HCl, 0,5M KCl, 15mM $MgCl_2$, 0,1% de gélatine) et le volume d'eau nécessaire pour combler un volume final de 50µL. Nous avons utilisé 2.5U de l'enzyme polymérase *Thermophilus aquaticus* (Taq) (Invitrogen) par réaction. Le programme d'amplification était composé de 35 cycles de polymérisation dans l'appareil T3 Thermocycler, Kirkland, CA. Le produit de PCR a été généré par 35 cycles de 1 minute de dénaturation à 94°C, 1 minute d'hybridation entre 50°C et 54°C (dépendant des amorces utilisées) et 1 minute d'extension à 72°C.

Les fragments, obtenus par PCR, ont été extraits et précipités avec du phénol chloroforme et digérés aux sites uniques avec les enzymes de restriction Hind III et Xba I. Les fragments, obtenus par digestion, ont subi une migration dans un gel d'agarose et ont été purifiés par la trousse de purification *GFX PCR DNA and Gel Band*.

Les fragments finaux de PCR ont été finalement insérés dans le vecteur d'expression PCDNA₃ en suivant le même cadre de lecture. Toutes ces constructions de plasmides recombinants ont été vérifiées par séquençage de l'ADN double brin

2.1.2 Digestion enzymatique

L'ADN plasmique et les produits de la PCR ont été digérés en utilisant les enzymes de restriction uniques: Hind III et Xba I. Cinq à dix unités d'enzyme ont été incubées à 37°C pendant deux heures avec de l'ADN et du tampon (*One-Phor-All Buffer PLUS*) dans un volume total de 30 µL pour l'insert et 50µL pour le vecteur.

2.1.3 Extraction et précipitation de l'ADN

Après le PCR, le volume obtenu est complété à 100µL avec du tampon TE (10mM tris ; 1mM EDTA ; pH=8) pour faciliter l'extraction de l'ADN. Nous avons additionné 1µL de SDS 10%, un volume (une fois le volume total) de Phénol-chloroforme, avant de vortexer et centrifuger pendant 3 minutes. Nous avons récupéré le surnageant et additionné deux volumes (deux fois le volumen total) d'éthanol 95%, lequel est maintenu à -20°C. Nous avons ensuite vortexé et précipité l'ADN à -80°C pendant 10 minutes suivit d'une centrifugation pendant 15 minutes à 4°C. Le culot obtenu après une centrifugation de 15 minutes est lavé à l'éthanol 70% à 4°C, par centrifugation et lyophilisé pendant 10 minutes. Finalement le culot est resuspendu dans du tampon TE.

2.1.4 Ligation

La ligation de fragments d'ADN a été effectuée dans un volume final de 20 μ L, en présence de l'enzyme T4 DNA ligase (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA) dans le tampon de ligation 10X (0,5 M Tris.Cl pH=7.6 ; 100 mM MgCl₂ ; 100 mM dithiothreitol; 2 mM d'ATP) pendant 16 heures à 16 °C.

2.1.5 Transformation

Le produit de ligation (20 μ L) a été introduit dans des cellules bactériennes compétentes XL-1 Blue par transformation. L'ADN a d'abord été incubé avec 100 μ L de cellules compétentes à 4°C pendant 60 minutes, puis les cellules ont subi un choc thermique à 42°C pendant 60 secondes. 800 μ L du milieu LB ont été rajouté aux cellules et celles-ci ont été ré-incubées sous agitation à 37°C pendant une heure avant d'être étalées sur un milieu sélectif contenant 50 μ g/ml d'ampiciline.

2.1.6 Minipréparation d'ADN

Les colonies isolées des pétris ont été répliquées, inoculées dans 5 mL de milieu LB contenant de l'ampiciline et incubées à 37°C avec agitation pendant 12 à 16 heures. Dans un premier temps le culot provenant de 1,5 mL de bouillon de culture a été resuspendu dans 100 μ L de GTE (50 mM glucose; 25 mM Tris-Cl, pH 8.0 ; 10 mM EDTA). Ensuite, 200 μ L de la solution de lyse ont été ajoutée (0,2M NaOH et 1% SDS) et mélangé par inversion. La réaction de lyse a été interrompue avec 150 μ L d'acétate de potassium 5M et mélangé rapidement. Après centrifugation, le surnageant a été précipité avec 1 mL d'éthanol 95%. Finalement le culot d'ADN a été lavé avec 500 μ L d'éthanol 70% et séché avant d'être resuspendu dans 100 μ L de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 contenant de la RNase. Cet ADN plasmique a été visualisé sur gel d'agarose et analysé par digestion enzymatique. Les bouillons de culture des

clones ayant intégré les bons inserts dans l'orientation désirée ont été ensuite utilisés pour inoculer 50mL de milieu LB afin d'isoler une grande quantité d'ADN plasmique de bonne qualité.

2.1.7 Maxipréparation d'ADN

L'ADN plasmique de clones sélectionnés a été isolé en utilisant la trousse de *Qiagen Plasmid Purification*, qui permet d'isoler rapidement de l'ADN de bonne qualité. Les procédures recommandées par le manufacturier ont été respectées (Qiagen plasmid purification protocols). Cette trousse est basée en une lyse alcaline et utilise des filtres (*QIAfilter Maxi*). L'ARN, les protéines, les colorants et les impuretés des faibles poids moléculaires sont éliminés par des lavages consécutifs avec des sels (solutions avec une quantité moyenne du sel). L'ADN plasmique est extrait dans un tampon à haute salinité, concentré et dessalé par précipitation à l'isopropanol.

2.1.8 Séquençage

L'ADN des constructions mutantes obtenues a été séquencé pour vérifier que l'utilisation de la technique de PCR n'a pas introduit une mutation, modifiant la séquence des acides aminés de la protéine encodée par cet ADN. Le séquençage a été effectué au Service de biologie moléculaire de l'IRCM (Institut de Recherches Cliniques de Montréal). L'ADN à séquencer était préparé dans de l'eau qui n'inhibe pas la réaction de séquençage. La quantité d'ADN utilisée dans la réaction de séquençage dépend de l'ADN (dsDNA plasmid, ssDNA plasmid, PCR product). Il est important de prendre en considération la quantité exacte d'ADN en moles. Pour l'ADN double brins, 50 à 100 fmol par réaction ont été préparés et pour les amorces (ssDNA plasmid) 25 à 50fmol par réaction. Cette préparation a été effectuée en

fonction de la taille de l'ADN double brins et de la quantité des acides aminés présentes dans les amorces.

2.2 Expression des constructions de plasmides

2.2.1 Cultures cellulaires

Des cellules tumorales hypophysaires de rat *GH4 (Rat Somatomammotrophic Cells)* et des cellules corticotrophiques de souris *AtT20 (Mouse Corticotrophic Cells)* ont été maintenues dans du milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium* pH=7,2). Ce milieu était additionné de 5 % de sérum de veau fœtal (FBS), 1 % de gentamicine (*Gentamicin Reagent Solution*) et de 0,1% de SerXtend (Irvine Scientific). Les cellules ont été incubées dans une atmosphère humide à 37 °C, 5 % de CO₂ et 90% d'air. Après une confluence de 80 %, les cellules ont été récupérées par traitement à la trypsine.

2.2.2 Construction de plasmides recombinants

Le plasmide pre-pro-Fc a été construit et utilisé comme témoin pour des expériences de pulse-chase, étant donné qu'il est sécrété par la voie de sécrétion constitutive. Ce plasmide était composé d'une portion de la chaîne lourde du fragment Fc de l'immunoglobuline IgG2b de souris (*Mouse Immunoglobulin IgG2b Heavy Chain*) précédé du peptide signal et de 6 acides aminés du prosegment de la prorénine; dans le vecteur d'expression PcPE4 (Invitrogen, Leek, The Netherlands). L'expression de ce vecteur est contrôlée par le promoteur CMV (*Cytomegalovirus*). Cette première construction a été effectuée par Danielle Méthot, ancienne étudiante du laboratoire.

Pour étudier la capacité de la queue C-terminale de PC5-A à diriger les protéines vers les granules de sécrétion, différentes régions de ce domaine ont été associées au fragment Fc de la chaîne lourde de l'immunoglobuline de souris (IgG2b), en C-terminal. Ce fragment Fc, comme mentionné précédemment, est lié au peptide signal et au prosegment. Les constructions, impliquant Fc ainsi que la queue de mPC5-A en C-terminal, ont été insérées dans le vecteur d'expression PcDNA₃ (Invitrogen, Leek, The Netherlands) qui a également comme promoteur CMV. Le codon stop de la chaîne lourde de IgG2b a été préalablement délété par PCR. Les portions du C-terminal de mPC5-A ont été synthétisées par PCR et insérées par ligation dans le vecteur d'expression PCDNA₃. Les amorces utilisées pour le PCR étaient les suivantes :

- Pour Fc-PC5(654-881), l'amorce sens 5'**GCAGATCTGTGCCGGAAGTT G** 3'
- Pour Fc-PC5(831-881), l'amorce sens 5'**GAAGATCTTCGACT TAAAC** 3'
- Pour Fc-PC5(844-881), l'amorce sens 5'**GCAGATCTGGCTACGGAAG AGGTC** 3,
- Pour Fc-PC5(849-881), l'amorce sens 5'**GCAGATCTGTGGGCAGAAGGAGG C** 3'

Ces amorces génèrent le site Bgl II : **AGATCT**

- Pour les plasmides Fc-PC5(654-881), Fc-PC5(831-881), Fc-PC5(844-881) et Fc-PC5(849-881), l'amorce antisens 5'**GCTCTAGAGCTCAG CCTTGG** 3' ; qui génère le site Xba I : **TCTAGA**

2.2.3 Mutagenèse dirigée

Des mutations ponctuelles ont été effectuées au plasmide Fc-PC5 (849-881), pour générer le plasmide Fc-PC5 (849-(P⁸⁵²-P⁸⁵⁸)-881). Un résidu alanine à la position 852 et un résidu glutamate à la position 858, ont été remplacés par deux prolines. Des amorces, renfermant ces deux mutations ponctuelles, ont été synthétisées. Ces

mutations ont été insérées par combinaison de deux produits de PCR, en utilisant les amorces chevauchantes suivantes:

- l'amorce sens ^{5'} **TGGGCAGAAccAGGCTTCTGT** ^{3'} et l'amorce antisens ^{5'} **ACAGAAGCCTTggTTCTGCCCCA** ^{3'} pour introduire la mutation **P⁸⁵²**
- l'amorce sens ^{5'} **TCTGTATGCTTccGAAAAAGAACA** ^{3'} et amorce antisens ^{5'} **TTGTTCTTTTTCggAAGCATACAGA** ^{3'} pour introduire la mutation **P⁸⁵⁸**.

Deux mutations ponctuelles, dans le plasmide Fc-PC5(844-881), ont été également effectuées, en changeant deux résidus glutamates par deux résidus glutamines, pour générer le plasmide Fc-PC5 (844-(Q⁸⁴⁶-Q⁸⁴⁷)-881). Les amorces chevauchantes suivantes ont été utilisées pour le PCR:

- l'amorce sens ^{5'} **GATGCTACGcAAcAGTCCTGGGCA** ^{3'} et l'amorce antisens ^{5'} **CCCAGGACTTgTTgCGTAGCCAGA** ^{3'} pour introduire les deux mutations **Q⁸⁴⁶** et **Q⁸⁴⁷**

La Figure 13 montre les mutations ponctuelles effectuée par PCR.

2.2.4 Transfection transitoire

L'ADN codant les différentes protéines de fusion pre-pro-Fc-PC5A ainsi que les formes mutantes de PC5-A a été inséré par transfection transitoire dans des cellules GH4 et AtT20 avec la trousse d'Effectene Transfection Reagent. Des pétris de 6 puits de 35mm ont étéensemencés avec 1x10⁶ cellules GH4 et 5x10⁵ cellules AtT20, 24 heures avant transfection. Les cellules étaient maintenues dans 2 mL de milieu DMEM supplémenté avec 5 % de FCS, 1 % de gentamicine et 0,1 % de Serxtend. Pour que la transfection soit efficace, les cellules doivent avoir une confluence de 40-80 % avant d'être transfectées. La procédure de transfection est illustrée dans la figure 14

Figure 13. Mutagenèse effectuée par PCR

Génération de mutations ponctuelles par la combinaison de deux produits de PCR que se chevauchent. Les amorces internes renferment la (ou les) mutation(s) désirée(s).

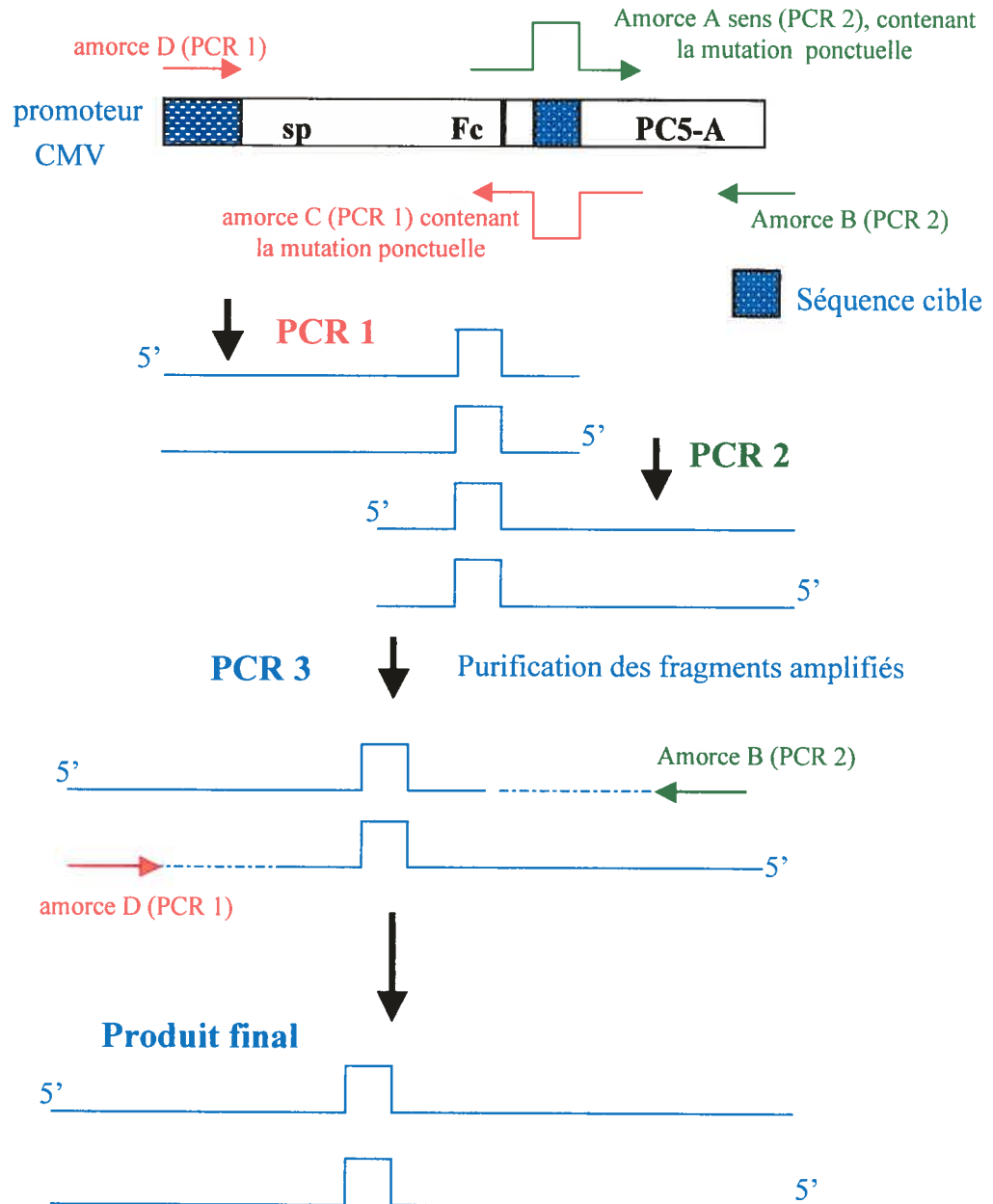
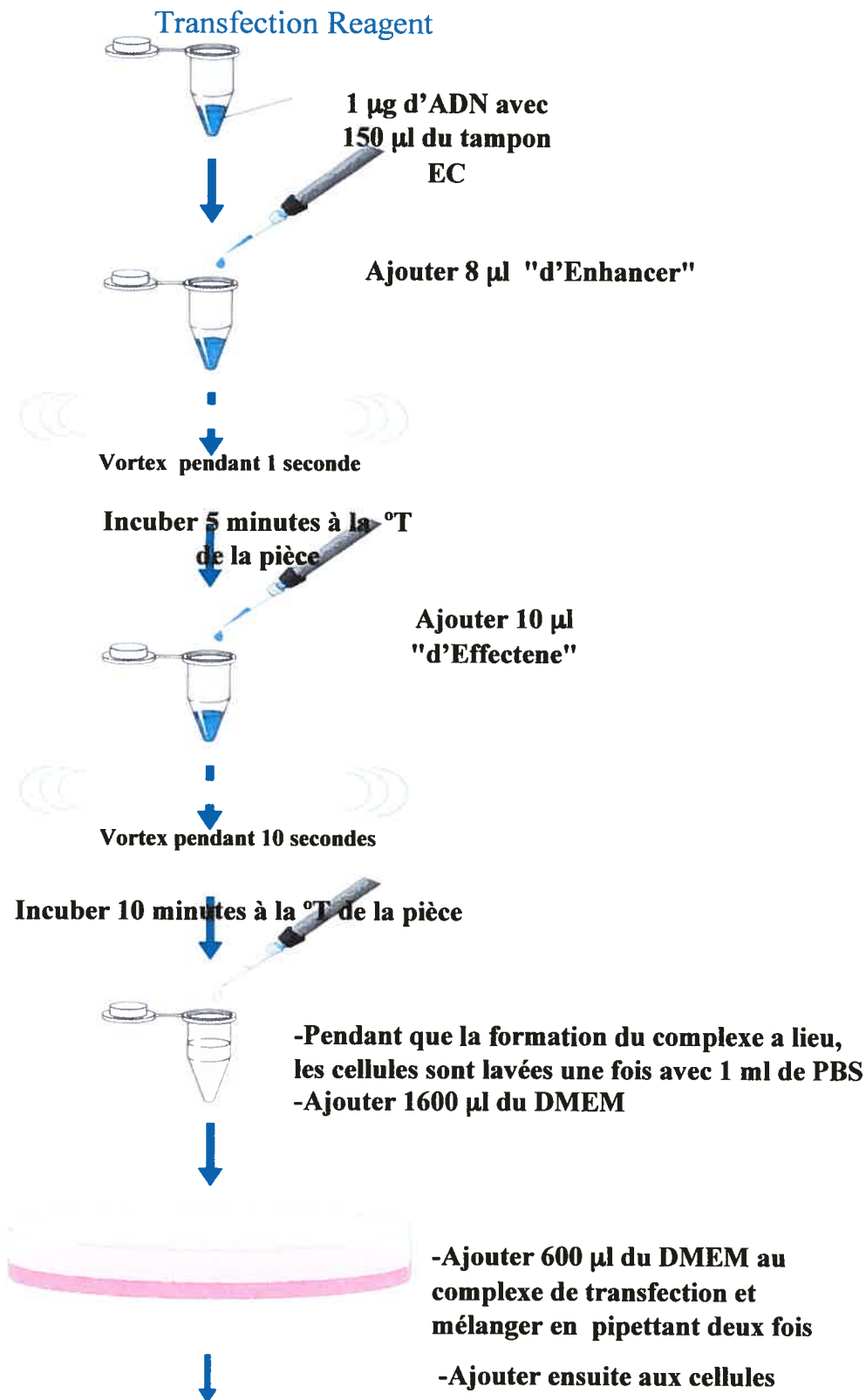


Figure 14. Transfection transitoire avec le kit Effectene



2.2.5 Coloration de cellules en culture transfectées avec X-Gal/ Expression β -Gal

Afin de connaître l'efficacité de transfection de la trousse d'Effectene Transfection Reagent, des colorations X-Gal ont été effectuées dans des cellules AtT20 et GH4 deux jours

post-transfection pour avoir une bonne expression du gène. Ces cellules étaient transfectées avec un plasmide qui contient le gène rapporteur β -gal. Ce gène se trouve dans le vecteur d'expression pcDNA₃ lequel est contrôlé sous l'action du promoteur CMV.

Le milieu a été aspiré et les cellules rincées deux fois avec du tampon PBS 1X. Les cellules ont été ensuite fixées à température ambiante pendant 10 min avec 2 mL du fixateur (1% de formaldéhyde et 0.2% de glutaraldéhyde dans du PBS 1X) par pétris de 35mm et rincer encore une fois avec du PBS 1X. Les cellules ont été ensuite colorées avec la solution de coloration X-Gal (5mM de ferricyanide de potassium, 5mM de ferrocyanide de potassium, 2mM MgCl₂, 1mg/mL de X-gal, 0.01% NaDOC et 0,02% de NP-40 dans du tampon PBS 1X) (2mL / pétri de 35 mm de diamètre) et incubées à 37°C pendant 4 heures ou toute la nuit dans l'obscurité.

La présence d'une coloration bleue dans des cellules, observées au microscope, indique une approximation du pourcentage de cellules qui ont incorporer le plasmide transfecté.

2.2.6 Marquage biosynthétique de protéines et stimulation de la sécrétion de SGs

Quarante-huit heures post-transfection, les cellules GH4 ainsi que les cellules AtT20 ont été lavées deux fois avec 1 mL de milieu réchauffé DMEM sans aucun supplément. Les cellules ont été ensuite privées de méthionine, pendant une heure à

37°C, en utilisant comme milieu d'incubation du DMEM dépourvu de méthionine et complété avec 5 % de FBS dialysé.

Des expériences de "Pulse-Chase" ont été réalisées. Les cellules ont été incubées avec 300 $\mu\text{Ci/mL}$ de $\text{L-}[^{35}\text{S}]$ pendant 30 min qui correspond au temps de "Pulse", afin de faire un marquage radioactif aux méthionines des protéines nouvellement biosynthétisées. Une incubation additionnelle, de trois heures pour les cellules GH4 et de cinq heures pour les cellules AtT20, avec du milieu DMEM (complété avec 5 % de FCS, 1 % de gentamicine et 0,1 % de Serxtend) a été ensuite effectuée sans le précurseur radioactif, ce qui correspond au temps de "Chase". Les deux lignées cellulaires ont été ensuite soumises à une stimulation par des sécrétagogues pour relâcher le contenu des SGs. Les cellules GH4 ont été incubées pendant 30 minutes dans du milieu DMEM contenant 50 mM de NaCl (indicateur de la sécrétion basale) et remplacées de nouveau, pendant 30 minutes, par du milieu DMEM contenant 50 mM de KCl qui stimule la relâche granulaire (indicateur de la sécrétion régulée). Dans les deux cas le milieu était complété avec 5 % de FCS, 1 % de gentamicine et 0,1 % de Serxtend. Pour la stimulation des cellules AtT20, deux incubations de 30 minutes ont été effectuées en parallèle, une en absence et une autre en présence de 10 μM de forskoline. Cette expérience a été effectuée dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO_2 et 90 % d'air.

2.2.7 Immunoprécipitation

Les protéines sécrétées par la voie régulée, qui se retrouvent dans le milieu DMEM des cellules transfectées, après stimulation par les sécrétagogues, ont été immunoprécipitées selon le protocole suivant :

Les surnageants des transfections (950 μL) ont été incubés avec 100 μL de méthionine froide 100 mM, 100 μL de tampon RIPA 2,5X final et 10 μL de protéine A sépharose à 4°C en rotation pendant toute une nuit. Le lendemain, les billes ont été lavées 3 fois

avec 500 mL de tampon RIPA 1X et une fois avec 500 mL de tampon PBS 1X. Les protéines immunoprécipitées étaient résuspendues dans 25 μ L de tampon à échantillons *Sample buffer* qui contient l'agent réducteur β -mercapthoéthanol. Elles ont été portées à ébullition pendant 8 minutes pour rompre la liaison Protéine A sépharose-Fc. Une fois les protéines éluées, elles ont été fractionnées dans un gel de polyacrylamine SDS-PAGE.

2.2.8 Gel d'électrophorèse de poly-acrylamide (PAGE)

Les échantillons, provenant des immunoprécipitations en conditions dénaturantes, ont été déposés sur des gels de poly-acrylamide 49,5 %T et 3 %C selon Schagger (*Tricine-SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. Schagger et von Jagow, 1987). Ils ont subi une migration de 1 h à 30V et de 90 minutes à 100V dans le gel de concentration et le gel de séparation, respectivement.

Les gels ont ensuite été fixés 45 minutes, rincés deux fois dans une solution de DMSO (10 % de PPO dans DMSO) pendant 15 minutes et soumis à un dernier lavage avec de l'eau pendant 5 minutes. Finalement, les gels ont été séchés et soumis à la fluorographie.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Chapitre 3 : Résultats

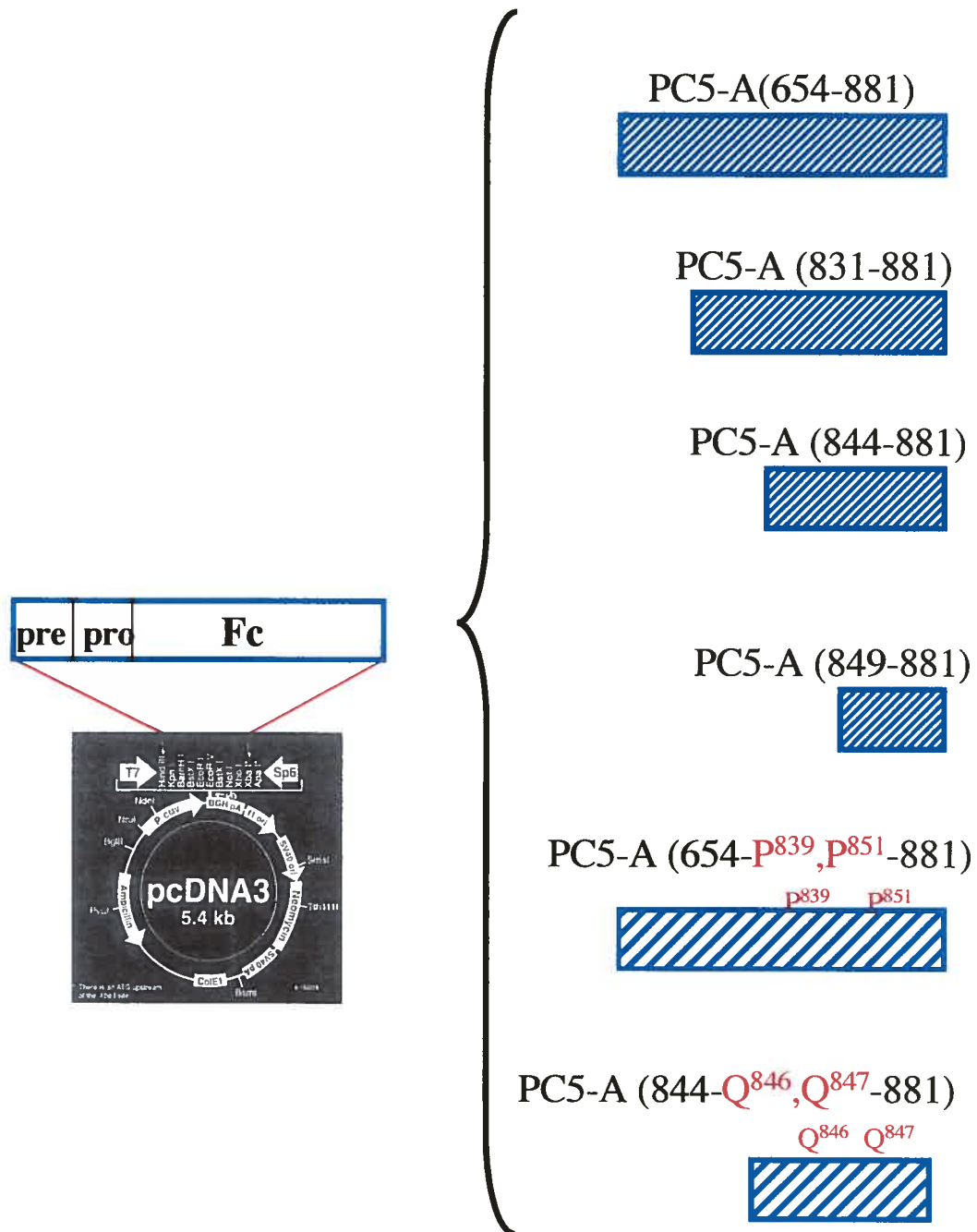
1. Constructions de plasmides recombinants

Nous avons construit des plasmides recombinants contenant le pre- et le prosegment de la prorénine en N-terminal, attaché à une région du fragment Fc de la chaîne lourde d'immunoglobuline de souris (IgG2b) et fusionné à différentes portions de la queue en C-terminal de PC5-A de souris. Les différentes constructions pre-pro-Fc-PC5A (délétions croissantes de la queue en C-terminal de PC5-A de souris) ont été insérées dans le vecteur d'expression PcDNA₃. Ces constructions étaient effectuées afin d'identifier les domaines importants qui seraient responsable du tri de la convertase PC5-A vers les granules de sécrétion.

Nous avons également construit deux formes mutantes correspondants aux plasmides pre-pro-Fc-PC5A(654-P⁸³⁹, P⁸⁵¹-881) et pre-pro-Fc-PC5A(844-Q⁸⁴⁶Q⁸⁴⁷-881), en utilisant le même vecteur d'expression PcDNA₃. La mutagenèse dirigée, aux sites spécifiques, a été basée sur les résultats des prédictions de structure secondaire en utilisant l'algorithme de Garnier-Osguthorpe-Robson. Un dessin des différents plasmides recombinant est montré dans la figure 15.

Comme mentionné précédemment différentes portions de la queue en C-terminal de PC5-A ont été synthétisées par PCR et insérées dans le vecteur d'expression PcDNA₃, lequel contenait préalablement le segment pre- et pro- de la rénine fusionné au fragment Fc. Des digestions enzymatiques aux sites uniques des plasmides recombinants ont été effectuées afin de savoir si les différentes portions en C-terminal de PC5-A ont été insérés dans le vecteur d'expression en suivant le bon cadre de lecture. Le séquençage des constructions a été effectué par la suite afin de vérifier si la technique du PCR n'as pas introduit des mutations modifiant la séquence des acides aminés.

Figure15 . Représentation des constructions de plasmides recombinants avec différentes régions de la queue C-terminale de PC5-A et les deux formes mutantes, dans le vecteur PCDNA₃



Nous avons utilisé deux systèmes d'expression : les cellules AtT20 (cellules *Corticotrophic* de souris) et les cellules GH4 (cellules *Somatomammotrophic* de rat), les quelles contiennent des granules de sécrétion.

2. Vérification du comportement des plasmides recombinants

2.1 Transfection des plasmides recombinants.

Nous avons exprimé les différentes constructions de plasmides recombinants dans les cellules GH4 et AtT20. Des transfections transitoires ont été effectuées en utilisant la trousse d'Effectene Transfection Reagent, une formulation lipidique non-liposomale, qui conduit à une haute efficacité de transfection. Cette trousse offre des avantages importants comparés à d'autres méthodes de transfection telles que l'électroporation, la transfection avec du phosphate de calcium et la transfection avec le composant lipidique lipofectamine, lesquelles ont été vérifiées par coloration X-gal. En effet, la trousse d'Effectene Transfection Reagent permet d'obtenir, avec très peu d'ADN, une transfection facile et rapide. Cette trousse permet également une efficacité de transfection assez élevée sans cytotoxicité considérable. Les différents paramètres tels que la quantité d'ADN, la quantité des différents composants de la trousse d'Effectene Transfection Reagent (le buffer EC, l'Enhancer et le composant Effectene) ainsi que la confluence des cellules (confluence de 80%) avant la transfection, ont été optimisés dans nos deux lignées cellulaires afin d'obtenir une haute efficacité de transfection.

Le plasmide, contenant le gène rapporteur β -gal dans le vecteur PcDNA₃, a été transfecté dans les cellules GH4 et AtT20, en utilisant les conditions du tableau I.

Une coloration X-gal 48 heures post-transfection a été effectuée par la suite afin de calculer le pourcentage approximatif de cellules qui ont incorporé de l'ADN

Tableau I . Conditions de transfection utilisées dans des lignées cellulaires GH4 et AtT20

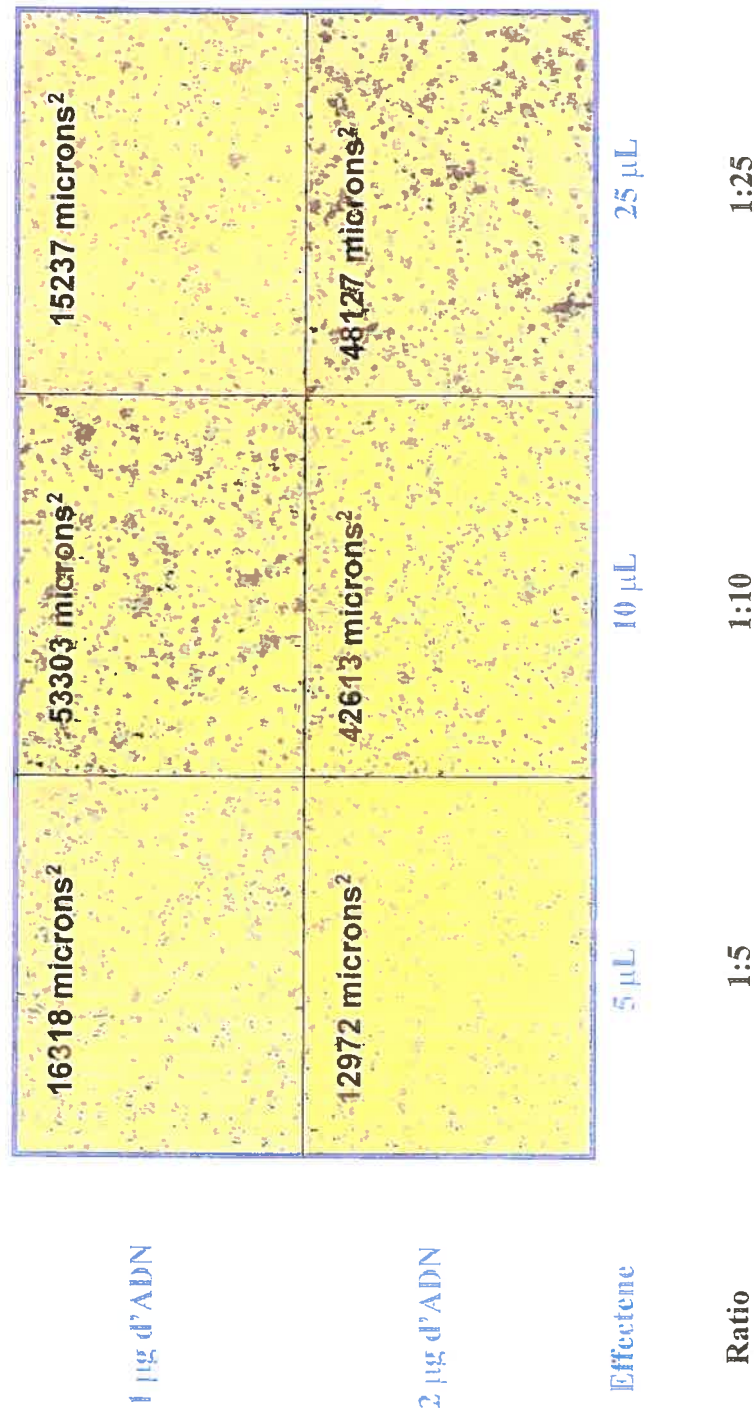
DNA(μ g)	Ratio ADN : Effectene		
	1:10	1:25	1:50
0.5	0.5 μ g ADN	0.5 μ g ADN	0.5 μ g ADN
	4.0 μ l Enhancer	4.0 μ l Enhancer	4.0 μ l Enhancer
	5.0 μ l Effectene	12.5 μ l Effectene	25.0 μ l Effectene
1.0	1.0 μ g ADN	1.0 μ g ADN	1.0 μ g ADN
	8.0 μ l Enhancer	8.0 μ l Enhancer	8.0 μ l Enhancer
	10 μ l Effectene	25.0 μ l Effectene	25.0 μ l Effectene

* Ces conditions étaient effectuées avec 1 000 000 de cellules GH4 dans des pétris de 36 mm

DNA(μ g)	Ratio ADN: Effectene		
	1:5	1:10	1:25
1.0	1.0 μ g ADN	1.0 μ g ADN	1.0 μ g ADN
	8.0 μ l Enhancer	8.0 μ l Enhancer	8.0 μ l Enhancer
	5.0 μ l Effectene	10.0 μ l Effectene	25.0 μ l Effectene
2.0	2.0 μ g ADN	2.0 μ g ADN	2.0 μ g ADN
	16.0 μ l Enhancer	16.0 μ l Enhance	16.0 μ l Enhancer
	10 μ l Effectene	20.0 μ l Effectene	50.0 μ l Effectene

* Ces conditions étaient effectuées avec 500 000 cellules AtT20 dans des pétris de 35mm.

Figure 16 Coloration X-Gal effectuée dans des cellules AtT20 transfectées avec un plasmide contenant le gène β -Gal



plasmique. La Figure 16 représente la coloration X-Gal effectuée dans des cellules AtT20 transfectées avec un plasmide contenant le gène β -gal.

Des transfections transitoires ont été effectuées basées sur des conditions optimisées pour chaque lignée cellulaire. Dans les cellules AtT20, nous avons utilisé 500 000 cellules, lesquelles ont été étalées 24 heures avant la transfection. Pour les cellules GH4, nous avons utilisé 1000000 cellules, étalées également 24 heures avant transfection. Ces paramètres ont été utilisés pour entreprendre des expériences de "Pulse-Chase".

2.2 Expériences de "Pulse-Chase"

Comme mentionné précédemment, les protéines nouvellement synthétisées qui rentrent à l'intérieur de la voie de sécrétion, commence leur cheminement à la membrane du RE. Ensuite, elles traversent les différents compartiments du Golgi afin de se rendre jusqu'au réseau trans-Golgien. Dans ce dernier compartiment de l'appareil de Golgi, les protéines sont triées vers les lysosomes, vers la voie constitutive ou vers la voie régulée. Pour le marquage biosynthétique de protéines, nous avons effectué des expériences de "Pulse-Chase". Après un marquage radioactif (pulse) de 30 minutes aux méthionines (^{35}S) des protéines nouvellement biosynthétisées, il resterait des protéines marquées (radioactivement) qui n'ont pas fini leur cheminement à travers la voie de sécrétion. Il est donc nécessaire de faire une incubation additionnelle, toute suite après le temps de pulse, sans le précurseur radioactif (chasse) afin de donner du temps à la libération de protéines qui sont sécrétées par défaut (voie constitutive). Après une chase plus longue par rapport au pulse, une stimulation avec des sécrétagogues, a été ensuite effectué, pour libérer le contenu des granules de sécrétion dans les deux systèmes d'expression : les cellules AtT20 (cellules *Corticotrophic* de souris) et les cellules GH4 (cellules *Somatomammotrophic* de rat). Ceci assure que les protéines sécrétées et récoltées dans le surnageant (après stimulation), soient seulement celles qui étaient acheminées

vers les granules de sécrétion. De cette manière, nous sommes certains de n'est pas avoir aucune contamination de la part de protéines sécrétées par défaut.

Une première expérience a été réalisée dans les cellules GH4 transfectées avec le plasmide recombinant pre-pro-Fc-PC5A(654-881), afin d'évaluer le temps du passage de la protéine de fusion à travers la voie de sécrétion. Nous avons utilisé comme contrôle négatif, le plasmide pre-pro-Fc, indicateur de la voie de sécrétion constitutive. L'incubation des cellules GH4 avec 50mM de sodium est un indicateur de la sécrétion basale. Finalement, nous avons incubé les cellules GH4 avec 50 mM de potassium afin de stimuler la relâche du contenu des SGs.

Les résultats de la figure 17 indiquent qu'un marquage radioactif de 30 minutes et une chasse de trois heures des deux protéines de fusion : pre-pro-Fc et pre-pro-Fc-PC5-A(844-881), est nécessaire avant de stimuler la relâche du contenu granulaire des cellules GH4 avec 50mM potassium.

La queue C-terminale de PC5-A présente un domaine de triage vers la voie de sécrétion régulée :

La figure 18 montre des cellules GH4 transfectées avec le plasmide pre-pro-Fc-PC5A (654-881). Cette expérience a été effectuée afin de savoir si la queue en C-terminal de PC5A présente un domaine qui incite le triage de la convertase PC5A vers les granules de sécrétion. Conformément aux résultats antérieurs, un marquage radioactif [³⁵S] de 30 minutes avec de la méthionine ³⁵S, a été effectué suivi d'une chasse de 3 heures avec de la méthionine pas marquée.

Nos résultats indiquent que la libération du contenu des SGs a été encore induite grâce à un traitement hypertonique en potassium. En effet, la concentration de potassium extracellulaire dans des cellules de mammifères est de 5 mM. Lorsque, les cellules GH4 transfectées étaient traitées avec une haute concentration de potassium (50 mM), la membrane plasmique des cellules est dépolarisée, ce qui stimule la libération du contenu des SGs. Donc, après le temps de "Pulse-Chase", comme dans

Figure 17. **a.** Passage de la protéine de fusion pre-pro-Fc à travers les voies de sécrétion **b.** Passage de la protéine de fusion pre-pro-Fc-PC5-A(844-881) à travers les voies de sécrétion.

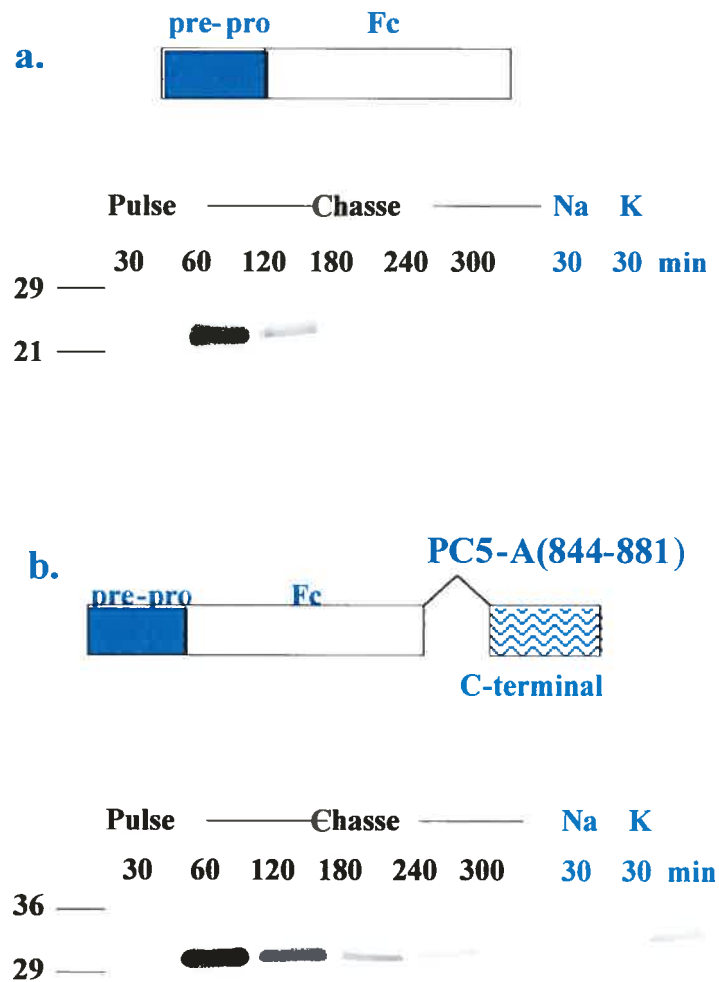
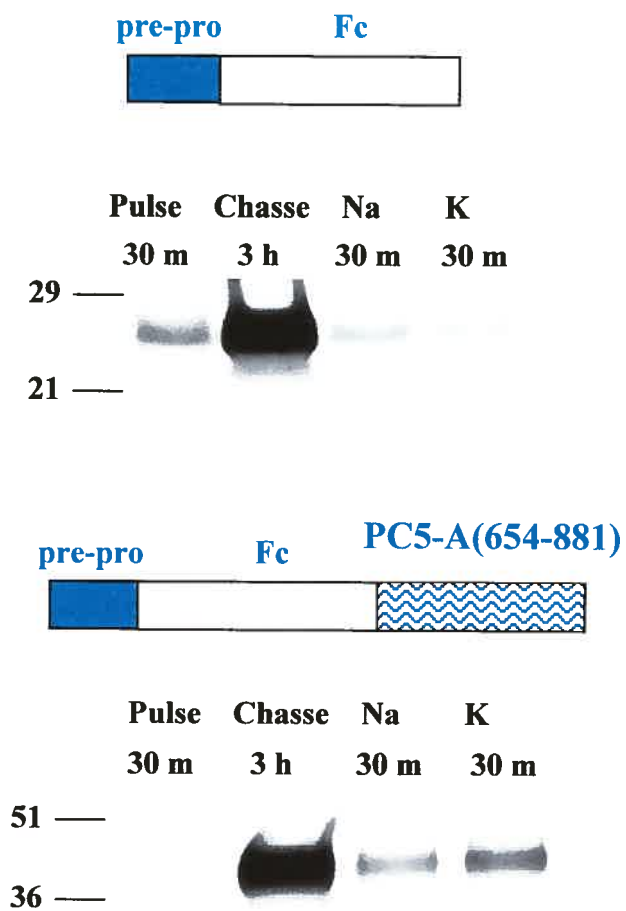


Figure 18 . La queue C-terminale de PC5-A contient un domaine de triage vers la voie de sécrétion régulée



l'analyse antérieure, les cellules GH4 ont été soumises à deux incubations simultanées : la première en présence de NaCl, pendant 30 minutes, pour estimer la sécrétion basale et la seconde en présence de KCl, pendant 30 minutes, pour stimuler la libération du contenu granulaire.

Contrairement au comportement du plasmide pre-pro-Fc-PC5A(654-881), le plasmide contenant le fragment Fc n'est pas trié vers les SGs des cellules GH4, ce qui indique sa sécrétion constitutive.

D'autre part le plasmide recombinant pre-pro-Fc-PC5A(654-881) présente un poids moléculaire supérieur à celui du contrôle pre-pro-Fc ce qui correspond à la région de la queue C-terminal de PC5A contenant les acides aminés entre 654 et 881.

Prédictions des structures secondaires indiquent que la queue en C-terminal de PC5-A (654-881) contiendrait une hélice α , semblable à la convertase PC1, cependant elle n'est pas responsable du triage de PC5-A vers les SGs :

Deux types d'algorithmes structuraux, l'algorithme de Garnier-Osguthorpe-Robson et l'algorithme de Chou Fasman, montré dans la figure 11, nous indiquent deux prédictions plausibles des hélices α dans la région C-terminal de PC5-A de souris. Pour savoir, si cette structure est impliquée dans le triage de PC5-A vers la voie de sécrétion régulée, le plasmide Fc-PC5-A(654-881) a été modifié par mutagenèse dirigée. La figure 19a montre la mutagenèse dirigée, où une alanine en position 839 et un acide glutamique en position 851 ont été remplacés par deux résidus prolines, générant le plasmide recombinant Fc-PC5 (654-(P⁸³⁹-P⁸⁵¹)-881). Des algorithmes structuraux prévoient que ces changements assurent la disparition de l'hélice α prédite par Garnier-Osguthorpe-Robson dans la région C-terminale de Fc-PC5A-(654-881). Par la suite, les deux plasmides recombinant Fc-PC5A-(654-881) et Fc-PC5 (654-(P⁸³⁹-P⁸⁵¹)-881) ont été transfectés en parallèle.

La figure 19b montre que la forme mutante, pre-pro-Fc-PC5 (654-(P⁸³⁹-P⁸⁵¹)-881) avec l'hélice α détruite selon l'Algorithme de Garnier-Osguthorpe Robson, serait triée vers les SGs. En effet l'analyse de "Pulse-Chase" montre que cette forme mutante présente un relâche du contenu granulaire stimulé par du potassium ce qui indique que l'hélice n'est pas responsable du triage de PC5-A vers les SGs.

La région de la queue C-terminale de PC5-A comprenant les acides aminés entre (849-881) est inefficace dans leur ciblage vers le SGs :

Étant donné que la région en C-terminal de PC5-A a un domaine de triage qui cible cette convertase vers les SGs, différentes portions de la queue en C-terminal de PC5A ont été transfectées dans les deux lignées cellulaires GH4 et AtT20. Cette expérience était effectuée afin de trouver une séquence minimale responsable du triage de PC5A vers la voie de sécrétion régulée. La figure 15 montre les délétions croissantes de la queue C-terminale de PC5A fusionnées au pre-pro-Fc dans le vecteur d'expression PcDNA₃.

La libération du contenu granulaire des cellules AtT20 a été stimulée grâce à l'action de la forskoline 10 μ M. La forskoline, un agent sécrétagogue qui a un effet sur la stimulation du contenu granulaire. Ce composant active l'adénylate cyclase, ce qui augmente la concentration de AMPc. La libération du contenu des SGs est donc induite par une diminution de la concentration de Ca⁺² suivi d'une augmentation de l'AMPc.

La figure 20 indique que la région de PC5A entre (849-881) était inefficace dans leur ciblage vers le SGs de cellules GH4. Cependant, les régions de la queue en C-terminal de PC5-A, contenant les acides aminés entre (831-881) et (844-881), engendre un résultat comparable à celui obtenu par la queue C-terminal complète (654-881) de PC5-A. La figure 21 montre que ces résultats sont aussi reproductibles

Figure 19. **a.** Représentation schématique de la forme native et mutée du plasmide Fc-PC5A(654-881) dans la queue en C-terminal de PC5-A et prédiction de l'hélice α dans cette région **b.** Résultats obtenus des transfections transitoires dans les cellules GH4 ayant pour contrôle positif le plasmide Fc-PC5A(654-881)

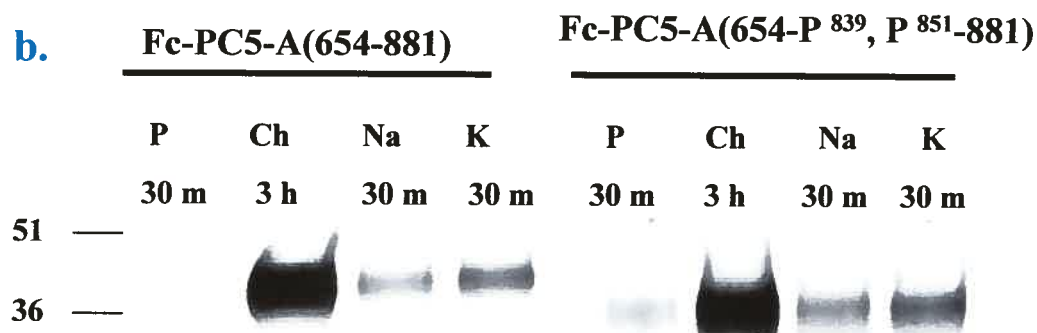
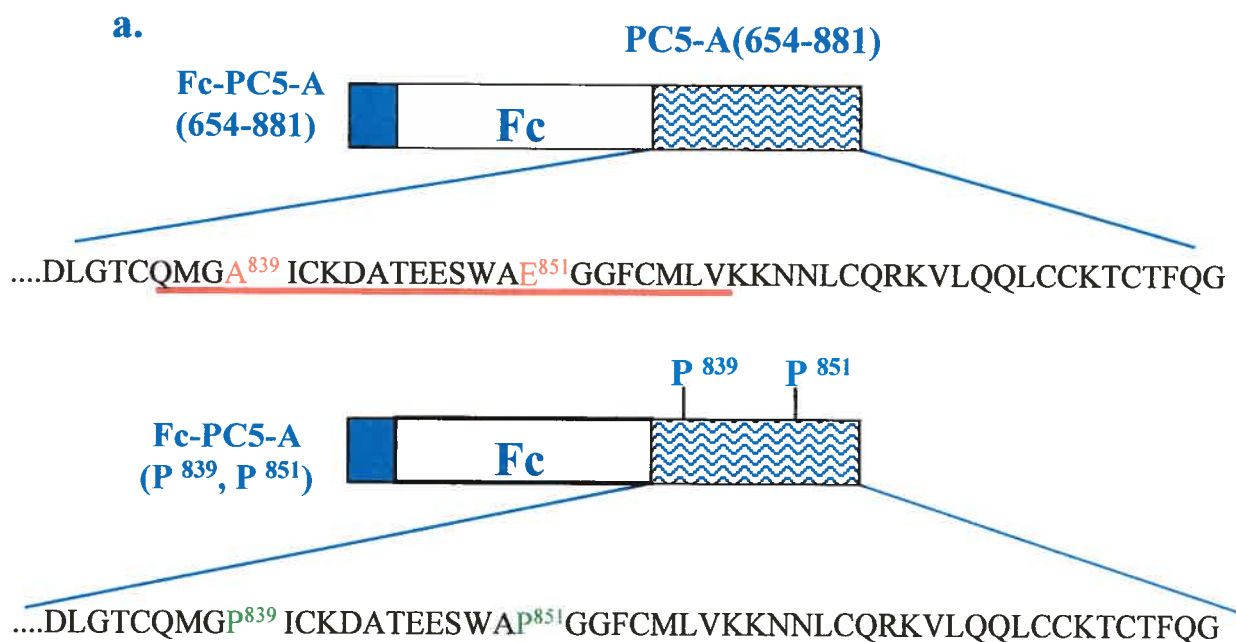


Figure 20 . Identification de la séquence de triage minimale dans la région en C-terminal de PC5-A des cellules GH4 qui est responsable de leur ciblage vers la voie de sécrétion régulée

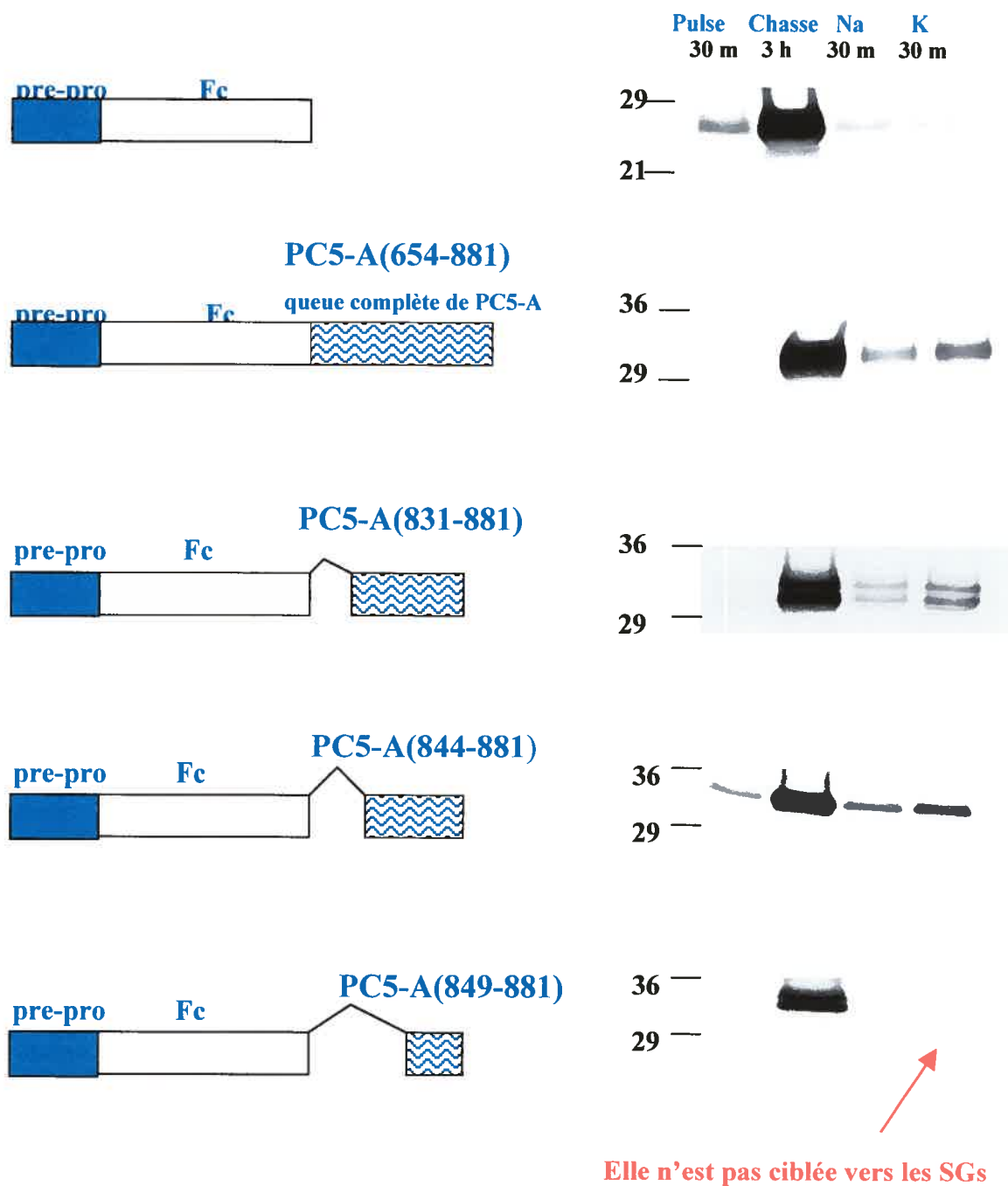
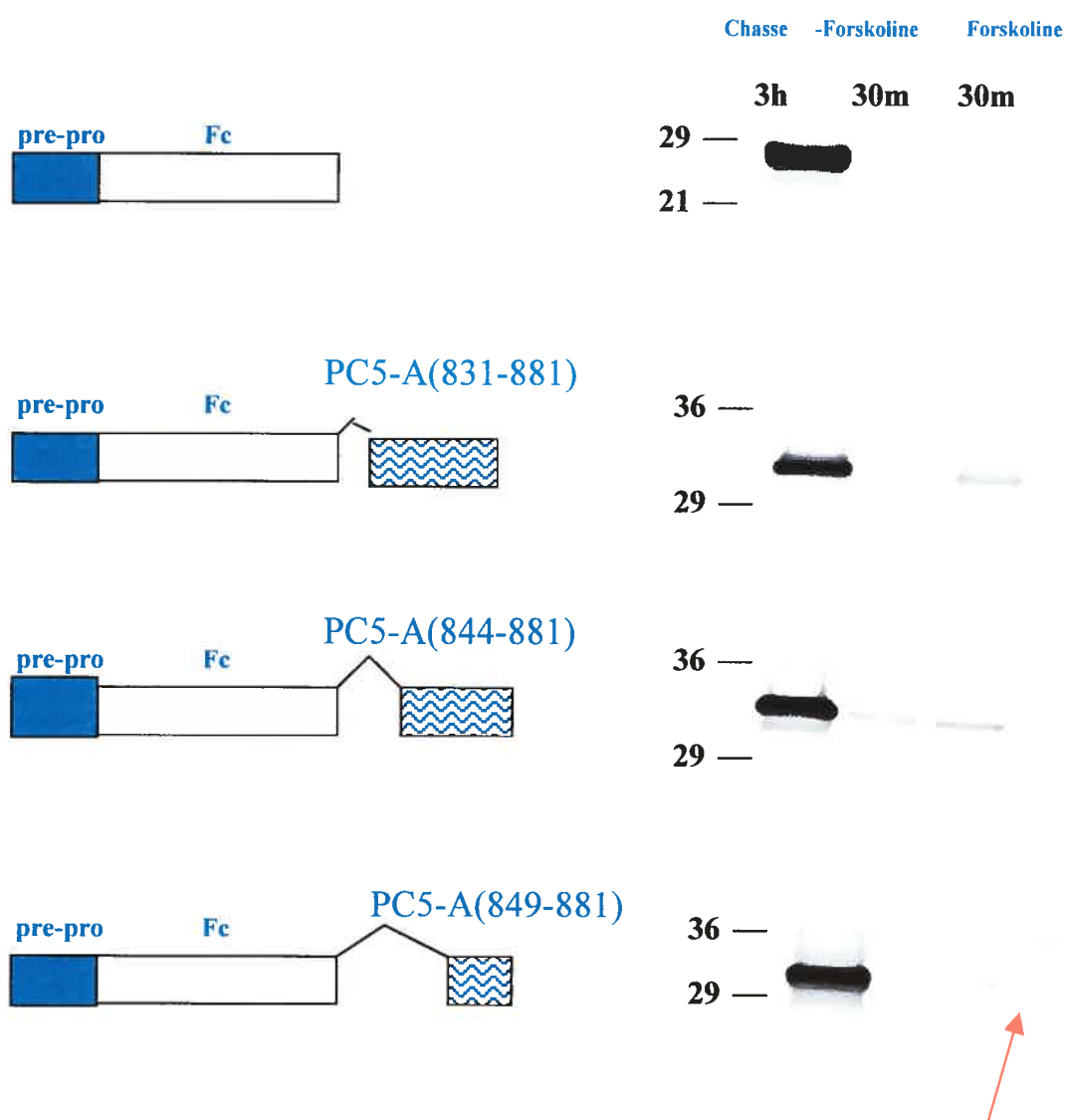


Figure 21. Identification de la séquence de triage minimale dans la région en C-terminal de PC5-A des cellules AtT20 qui est responsable de leur ciblage vers la voie de sécrétion régulée



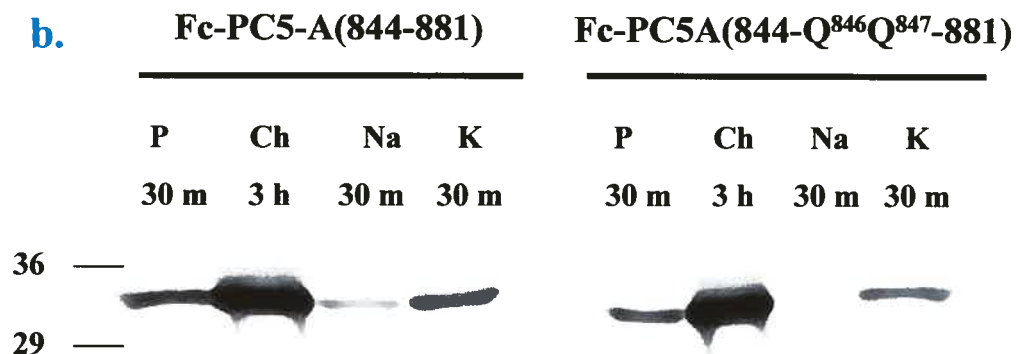
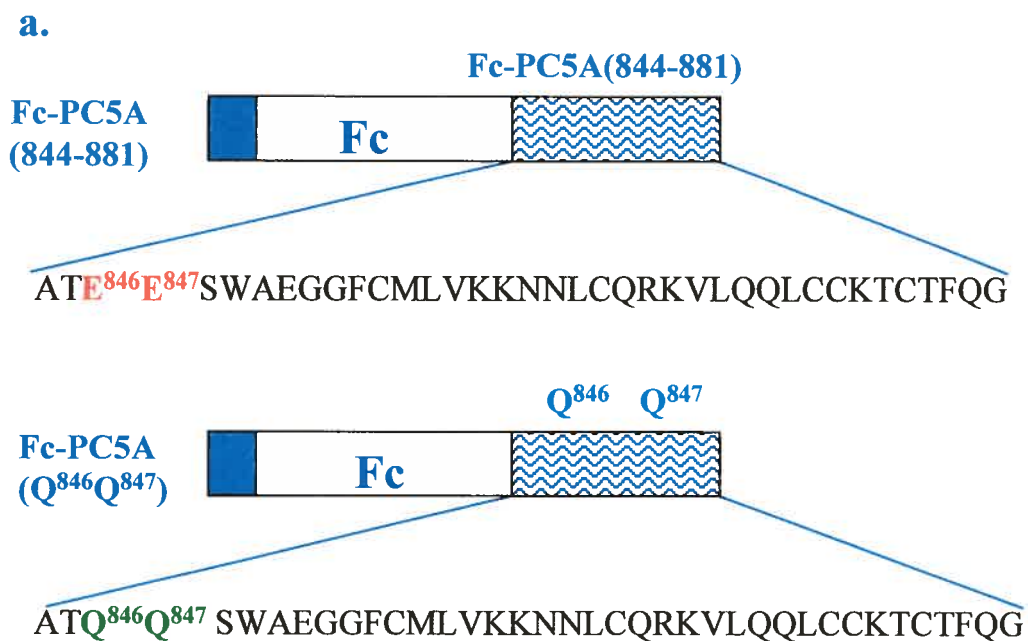
Elle n'est pas ciblée vers les SGs

dans le système de cellules AtT20, où nous avons obtenu que le ciblage de la protéine de fusion pre-pro-Fc-PC5A(849-881) vers les granules de sécrétion était également inefficace.

Deux acides glutamiques n'ont pas aucun effet sur le triage de la convertase PC5-A vers les granules de sécrétion :

Etant donné qu'il existe une différence de cinq acides aminés (ATEES) entre le plasmide recombinant Fc-PC5-A(844-881) qui est ciblé vers les granules de sécrétion et le plasmide pre-pro-Fc-PC5-A(849-881) qui n'est pas ciblé vers les SGs. Nous avons vérifié l'importance des deux acides aminés glutamiques, observés dans la séquence ATEES du plasmide pre-pro-Fc-PC5-A(844-881), pour le ciblage de PC5-A vers les SGs. Par mutagenèse dirigée en utilisant du PCR, nous avons construit le plasmide recombinant pre-pro-Fc-PC5(844-Q⁸⁴⁶Q⁸⁴⁷-881) dont les deux résidus glutamates (Glu E) ont été remplacés par deux résidus glutamines (Gln Q) (Figure 22a) Nous avons transfecté ce plasmide muté pre-pro-Fc-PC5(844-Q⁸⁴⁶Q⁸⁴⁷-881) en utilisant comme contrôle négatif la forme native du plasmide pre-pro-Fc PC5A(844-881). La figure 22b démontre que le plasmide pre-pro-Fc-PC5(844-Q⁸⁴⁶Q⁸⁴⁷-881) est ciblé vers les granules de sécrétion de cellules GH4. Donc, les deux acides glutamiques n'ont pas un effet sur le triage de la convertase PC5-A vers les SGs.

Figure 22. **a.** Représentation schématique de la forme native et mutée du plasmide Fc-PC5A(844-881) dans la queue en C-terminal de PC5-A **b.** Résultats obtenus des transfections transitoires dans des cellules GH4



CHAPITRE 4

DISCUSSION

Chapitre 4 : Discussion

Au cours des dernières années, différentes études ont été menées, afin d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la sécrétion régulée de différentes protéines telles que l'insuline, l'hormone de croissance (GH), l'hormone adenocorticotrophique (ACTH), la prorénine, etc. La plupart des connaissances de signaux de triage proviennent des expériences de transfection de protéines chimériques. En effet, en utilisant ces expériences, il a été démontré que des protéines comme la proopiomelanocortine (POMC) par exemple présentent un signal de triage vers la voie de sécrétion régulée en N-terminal, correspondant à une boucle constituée d'un pont disulfure (Cool *et al*, 1995). La présence d'une boucle similaire était également trouvée dans la chromogranine A (CgA) (Thiele *et Huttner*, 1998) et la chromogranine B (CgB) (Chanat *et al*, 1993 ; Chanat *et al*, 1994 ; Krömer *et al*, 1998) en faisant des délétions dans des régions essentielles pour le triage vers la voie de sécrétion régulée. Une autre étude démontre que le prosegment de l'ANF est impliquée dans son triage vers les SGs. Le triage de cette protéine est en effet corrélé avec son agrégation qui est contrôlé par le calcium et le pH (Canaff *et al*, 1996). Ainsi, une grande quantité de protéines ont été étudiée afin d'identifier des signaux de ciblage qui les ciblent vers la voie de sécrétion régulée. Cependant, jusqu'à présent les éléments structuraux impliqués dans le triage de la plupart de ces protéines vers les SGs, ne sont pas encore bien caractérisés.

À l'aide d'un motif de ciblage, le tri d'une protéine vers la voie de sécrétion régulée peut être testé de deux manières. La première consiste à la création d'une protéine de fusion où un motif de triage est ajouté à une protéine qui emprunte normalement la voie constitutive. La seconde est basée sur la génération de délétions ou des mutations ponctuelles à l'intérieur du motif de ciblage d'une protéine qui emprunte la voie de sécrétion régulée. Alors, la protéine pourrait être encore réacheminée vers la

voie de sécrétion constitutive. Ces deux approches ont été utilisées pour nos expériences.

Il faut remarquer qu'on pourrait avoir un problème potentiel en utilisant de protéines chimériques. Les différentes mutations ou délétions dans le motif de triage putatif peuvent modifier le patron normal du repliement de la protéine conduisant à un mauvais ciblage ou à sa rétention à l'intérieur du RE. Par contre, l'utilisation de protéines chimériques a résous plusieurs questions sur le motif de triage putatif de plusieurs protéines.

Notre vecteur d'expression PcDNA₃ contenait comme insert la région en C-terminal de PC5-A, fusionné à une portion de la chaîne lourde du fragment Fc d'IgG2b, précédé par le peptide signal et le prosegment de la prorénine. Ce dernier correspondait seulement aux 6 acides aminés importants pour le clivage du prosegment de la prorénine.

Nous avons utilisé comme contrôle négatif le plasmide recombinant pre-pro-Fc. Le fragment Fc de la protéine n'est pas retenu à l'intérieur de SGs et est un excellent échafaud pour tester les domaines de ciblage étant donné qu'il est facilement détecté par sa région de liaison à la protéine A Sepharose dans des cellules transfectées.

Contrairement aux cellules CHO et BSC40 qui sont des cellules neuroendocrines dépourvues des granules, les cellules GH4 et AtT20 étaient utilisées pour nos transfections transitoires, car elles comportent des SGs. Ces cellules ont été utilisées de manière considérable par des études précédantes où la biogenèse des granules ainsi que le triage des protéines vers les SGs étaient examinés. En effet, un système modèle de cellules AtT20 par exemple a permis d'obtenir la première évidence que les cellules provenant de différents tissus utilisent un mécanisme commun pour le triage de protéines vers les SGs. Il a été également rapporté que dans des cellules AtT20 la protéine endogène POMC est triée vers les SGs, clivée en ACTH et en d'autres peptides ; et toutes sont relâchées en réponse au AMP cyclique.

Nous avons vérifié le comportement du plasmide recombinant qui contient la queue complète de PC5-A (654-881). Nos résultats fournissent des preuves en faveur de l'existence d'un domaine de triage dans la région en C-terminal de PC5-A qui serait capable d'entraîner cette convertase vers la voie de sécrétion régulée des cellules GH4 transfectées. Ces résultats sont en accord avec des rapports précédents obtenus dans notre laboratoire, où une protéine de fusion, transfectée dans des cellules GH4 qui contiennent des acides aminés de la queue en C-terminal de PC5A (844-881), est ciblée vers la voie régulée en plus de multimériser. PC5-A formerait des dimères 2N qui semblent être mieux triés vers les SGs que les monomères N, les trimères 3N et les tétramères 4N observés. Cette multimérisation semble également être plus évidente dans PC5-A que dans la convertase PC1 (résultats non rapportés). Ces résultats concordent également avec une étude publiée par De Bie et collègues, où la présence d'un mutant manquant des 38 derniers acides aminés de la queue en C-terminal de PC5A ne rentre pas efficacement à l'intérieur de la voie de sécrétion régulée (De Bie *et al*, 1996).

Notons que dans certaines de nos expériences, une petite libération du contenu granulaire a été observée en présence de sodium, ce qui est un indicateur de la sécrétion basale. Dans cette sécrétion, les granules de sécrétion immatures se fusionnent probablement avec la membrane plasmique, ce qui résulte en une apparente sécrétion constitutive de protéines qui étaient destinées à aller aux SGs. À ce stade de biosynthèse protéique, les granules de sécrétion se trouvent près de la membrane plasmique et sa libération peuvent être facilement déclenchée, pendant la pré-incubation des cellules GH4 avec du sodium.

D'autre part, l'algorithme structural de Garnier-Osguthorpe-Robson qui donne des prédictions des structures secondaires (Garnier *et al*, 1978), prévoit une hélice α dans la région en C-terminal de PC5-A. Des mutations ponctuelles ont été effectuées dans la région comprenant les 50 derniers acides aminés de la queue en C-terminal de PC5A, où selon l'Algorithme de Garnier-Osguthorpe-Robson la présence d'une hélice α était prévue. Ces mutations ont été effectuées afin de vérifier si la prédiction

de structure secondaire était responsable du triage de PC5-A vers les SGs. Selon l'algorithme structural de Garnier-Osguthorpe-Robson, le remplacement de deux acides aminés, l'alanine à la position 839 et l'acide glutamique à la position 851, par deux prolines, entraînerait la disparition de cette structure secondaire. Cette protéine de fusion mutée, pre-pro-Fc-PC5-A (654-(P⁸³⁹, P⁸⁵¹)-881), a été testée en prenant comme contrôle positif le plasmide pre-pro-Fc-PC5A (654-881). Nos résultats démontrent que la perturbation dans la structure de l'hélice α dans le plasmide pre-pro-Fc-PC5-A (654-881) ne ciblerait pas cette protéine de fusion vers la voie constitutive. Ainsi, l'hélice α prévue dans PC5A (contrairement à la convertase PC1) ne serait pas responsable du triage de cette convertase vers les SGs. Il faut mentionner qu'une hélice α est également prédite dans la région en C-terminal de PC2, une autre convertase de la voie de sécrétion régulée. Cependant, il ne faut pas oublier que cette structure représente seulement une prédiction.

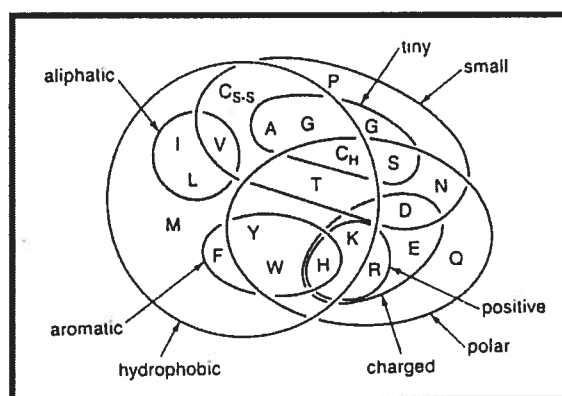
Même si l'hélice α n'est pas responsable du triage de la convertase PC5-A vers les SGs, il existe toutefois un domaine de triage dans sa queue en C-terminal. Afin d'identifier un domaine de triage minimal dans cette région responsable du triage de PC5-A vers les SGs, nous avons construit des protéines de fusion contenant des délétions croissantes de la queue C-terminale de PC5-A. Les plasmides recombinants ont été transfectés et exprimés dans les lignées cellulaires GH4 et AtT20. Nos résultats indiquent que toutes les protéines de fusion étaient exprimées dans les cellules GH4 à des niveaux comparables pendant les périodes de marquage (pulse), les périodes de chase et pendant la relâche granulaire. Cette expérience nous montre également l'existence d'un domaine minimal de ciblage, qui est présent dans le plasmide recombinant pre-pro-Fc-PC5A(844-881). Nos résultats ne sont pas une particularité des cellules GH4, mais ont été obtenus avec les lignées cellulaires AtT20. Cependant, le niveau d'expression des plasmides recombinants de ces cellules était beaucoup plus faible comparé à celui des cellules GH4. Notons aussi la présence de deux bandes dans l'expression du plasmide recombinant pre-pro-Fc-PC5A(831-881). Ces deux bandes pourraient correspondre à des modifications post-traductionnelles, cependant en regardant la séquence de la queue C-terminale ajoutée

(831-881) on observe qu'il n'existe pas *a priori* des séquences consensus correspondant à des sites pour des modifications post-traductionnelle. Par contre cette possibilité ne peut pas totalement exclut. Ce résultat pourrait également correspond à l'état de dénaturation de la protéine. Probablement cette protéine est moins facilement dénaturée. Une autre possibilité est que cette protéine pourrait être plus sensible à l'action de protéase ce qui donne une protéine partiellement dégradée.

D'autre part, la différence de cinq acides aminés, entre les plasmides pre-pro-Fc-PC5A(844-881), qui est ciblé vers la voie régulée, et pre-pro-Fc-PC5A(849-881), qui est ciblé vers la voie constitutive, correspond à la séquence ATEES. Ce résultat confirme encore l'étude de Bie et collègues, où les 38 derniers acides aminés en C-terminal de PC5-A semblent être importants pour le triage de PC5-A vers les SGs. Le mutant (PC5-A Δ 38) dans cette étude, dont les 38 derniers acides aminés ont été délétés, contrairement au type sauvage PC5-A(844-881), ne pénètre pas dans les SGs des cellules GH4 transfectées. La séquence ATEES du plasmide recombinant Fc-PC5-A(844-881), permet encore d'établir un lien avec une étude sur le facteur natriurétique (ANF pour *Atrial Natriuretic Factor*) où la présence des deux acides glutamiques, dans le prosegment, était importante pour le ciblage de l'ANF vers les SGs (Brechler *et al*, 1996). *In vivo*, le proANF est emmagasiné à l'intérieur des SGs. Plusieurs modèles ont été développés afin de savoir comment le proANF se dirigeait vers la voie de sécrétion régulée. *In vitro*, le proANF montre également une liaison au Ca^{+2} lorsqu'il est en forte concentration et dans un environnement acide. Ces conditions, qui sont principalement trouvées dans le réseau trans-Golgien, faciliteraient son agrégation. Un des modèles qui explique le triage des protéines vers la voie de sécrétion régulée propose l'événement d'agrégation qui pourrait servir de signal d'encapsulation et bourgeonnement des protéines dans les ISGs ou comme facteur de rétention des protéines dans les SGs. De plus, il pourrait dépendre de différents facteurs comme le pH, le Ca^{+2} ainsi que des interactions protéine-protéine (Canaff *et al*, 1996). La présence de deux acides aminés glutamiques (Glu) simultanés à la position 23 et 24 du prosegment de l'ANF, serait importante pour la sécrétion régulée ainsi que pour leur agrégation. En effet, les deux acides glutamiques

mutés par deux glutamines ont un effet considérable sur le triage de l'ANF vers la voie de sécrétion régulée. Ce résultat nous a incité à vérifier l'importance des deux acides aminés glutamiques, observés dans la séquence ATEES du plasmide Fc-PC5-A(844-881), dans le ciblage de PC5-A vers les SGs. Par mutagenèse dirigée, nous avons donc construit le plasmide Fc-PC5(844-Q⁸⁴⁶Q⁸⁴⁷-881) dont les deux acides glutamiques (Glu E) ont été remplacés par deux résidus glutamines (Gln Q). Nous avons donc testé l'implication des deux acides glutamiques de la queue C-terminale de PC5-A dans le ciblage de PC5-A vers les granules de sécrétion. Ces changements ont été choisis en tenant compte de la relation entre les 20 acides aminés illustrée sous la forme de diagramme de Venn (figure ci-dessous). Ce diagramme sélectionne les propriétés physico-chimiques importantes dans la détermination de la structure de la protéine. Les acides aminés dans ce diagramme sont divisés en trois groupes : le groupe polaire, le groupe hydrophobique et le groupe des petits acides aminés

Diagramme de Venn montrant la relation entre les 20 acides aminés



Les acides aminés glutamine [Q ou Gln] et glutamate [E ou Glu] présentent des différences dans leurs chaînes latérales -R. La glutamine possède une chaîne latérale polaire neutre, alors que le glutamate présente une chaîne latérale acide. Nous avons remplacé les deux glutamates dans la séquence TEES par deux glutamines. Ce changement cause la destruction de l'hélice α selon l'algorithme de Garnier-

Osguthorpe-Robson. Le plasmide recombinant pre-pro-Fc-PC5(844-Q⁸⁴⁶Q⁸⁴⁷-881) a été construit par mutagenèse dirigée et transfecté dans des cellules GH4, en utilisant comme contrôle positif le plasmide pre-pro-Fc- PC5A (844-881).

Nos résultats montrent que les deux acides amines glutamates de la séquence ATEES de la queue en C-terminal de PC5-A n'induit pas le triage de PC5-A vers les SGs. D'autre part, l'ANF présente plusieurs régions de liaison du Ca⁺² qui étaient précédemment rapportées dans leur prosegment. De plus, la région du pro-ANF responsable de son ciblage vers la voie de sécrétion régulée ne contient pas seulement deux acides glutamiques, mais aussi cinq résidus aspartiques (groupe -R acides). Ceux-ci créent une charge totale négative de -8. Il a été proposé que ce regroupement d'acides aminés, avec des groupes -R acides, pourrait lier le Ca⁺², ce qui conduit à l'agrégation de l'ANF. Cette agrégation aiderait au triage de l'ANF vers la voie de sécrétion régulée.

Afin de tester le triage de PC5-A, deux hypothèses ont été présentées : la première consiste en un modèle qui présente une interaction entre la convertase PC5-A et son substrat ainsi qu'en la présence d'une hélice α en C-terminal de PC5-A qui le ciblerait vers les SGs. Cependant, nos résultats indiquent que la prédiction de l'hélice α n'est pas responsable de ce triage. À la recherche d'un domaine de triage minimal qui cible PC5-A vers les SGs, nous avons proposé une deuxième hypothèse où la présence de deux acides glutamiques, dans la séquence ATEES, seraient probablement impliqués dans le triage de PC5-A vers les SGs. Cependant, nous avons conclu que ces acides aminés ne semblent pas avoir d'effet sur le triage.

Ces résultats nous amènent à dire qu'il existe probablement plusieurs autres mécanismes impliqués qui ciblent PC5-A vers les granules de sécrétion. Quelques protéines comme l'insuline par exemple qui s'agrège, forme des multimères, se lie à la CPE et est clivée par PC1 et PC2, peut combiner plusieurs de ces mécanismes conduisant à une augmentation de son efficacité de triage vers les SGS. En effet l'insuline est triée vers les SGs avec une efficacité de plus de 95%. Autrement, la

prorénine, qui est seulement triée vers les SGs avec une efficacité de 25-30% *in vivo* et en cellules transfectées, peut seulement utiliser un mécanisme de ciblage. La prorénine est clivée une fois par la convertase PC1 et elle montre une tendance à s'agréger ou former des multimères.

L'existence des multiples signaux de triage dans une protéine peut expliquer la difficulté dans l'identification des domaines de triage. La combinaison des différents mécanismes de triage et la possibilité de former des complexes stables avec des enzymes PCs pourraient diriger le co-ciblage des enzymes PCs et leurs substrats vers les SGs.

Directions futures

Il serait intéressant de confirmer les résultats obtenus dans les cellules AtT20 et GH4 avec des expériences en utilisant des cellules PC12, qui sont des cellules neuroendocrines de souris. Ces résultats permettront de déterminer s'ils sont spécifiques au type cellulaire.

Par ailleurs, il serait intéressant de définir les domaines de triage de la convertase PC2 dans le contexte de la protéine de fusion afin de déterminer le domaine minimal de triage qui cible cette protéine vers les SGs. Enfin, tester la fonction de l'hélice α prédite en C-terminal selon l'algorithme de Garnier-Osguthorpe-Robson sur le triage de cette convertase vers les SGs.

En dépit de la relation fonctionnelle entre PC1 et PC5 et étant donné que leurs mécanismes d'entrée dans les granules semblent diverger, il serait intéressant de connaître le mode d'action de PC2 dans leur triage vers la voie de sécrétion régulée.

CONCLUSION

-Nous avons démontré que l'extrémité en C-terminal de PC5-A présente un domaine de ciblage vers les granules de sécrétion dans les cellules GH4 et AtT20.

-Nous pouvons également affirmer que l'hélice α dans la queue C-terminal de PC5-A n'est pas nécessaire pour son ciblage vers la voie de sécrétion régulée dans les cellules GH4. Cependant, il existe un domaine de ciblage minimal qui est responsable du ciblage de PC5-A vers les granules de sécrétion et qui est localisé entre les résidus 844 et 881. Ceux-ci correspondent aux 38 derniers acides aminés de sa queue en C-terminal de PC5A, quoiqu'il ne soit pas probablement le seul.

-Nos résultats indiquent également que la présence des deux glutamates en C-terminal de PC5-A n'est pas suffisante pour son ciblage de cette convertase vers les granules de sécrétion.

BIBLIOGRAPHIE

- Abifadel, M., M. Varret, J. P. Rabes, D. Allard, K. Ouguerram, M. Devillers, C. Cruaud, S. Benjannet, L. Wickham, D. Erlich, A. Derre, L. Villeger, M. Farnier, I. Beucler, E. Bruckert, J. Chambaz, B. Chanu, J. M. Lecerf, G. Luc, P. Moulin, J. Weissenbach, A. Prat, M. Krempf, C. Junien, N. G. Seidah, and C. Boileau.** 2003. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat.Genet.* **34**:154-156.
- Allan, B. B. and W. E. Balch.** 1999. Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments. *Science* **285**:63-66.
- Anderson, E. D., S. S. Molloy, F. Jean, H. Fei, S. Shimamura, and G. Thomas.** 2002. The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J.Biol.Chem.* **277**:12879-12890.
- Anderson, E. D., J. K. VanSlyke, C. D. Thulin, F. Jean, and G. Thomas.** 1997. Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J.* **16**:1508-1518.
- Arvan, P. and D. Castle.** 1998. Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem.J.* **332** (Pt 3):593-610.
- Arvan P, Castle D.** 1992. Protein sorting and secretion granule formation in regulated secretory cells. *Trends Cell Biol.* **2**(11):327-31.
- Ayoubi, T. A., H. L. van Duijnhoven, W. J. van de Ven, B. G. Jenks, E. W. Roubos, and G. J. Martens.** 1990. The neuroendocrine polypeptide 7B2 is a precursor protein. *J.Biol.Chem.* **265**:15644-15647.
- Baillyes EM, Shennan KI, Seal AJ, Smeekens SP, Steiner DF, Hutton JC, Docherty K.** 1992. A member of the eukaryotic subtilisin family (PC3) has the enzymic properties of the type 1 proinsulin-converting endopeptidase. *Biochem J.* **285** (Pt 2):391-4.
- Bannykh SI, Balch WE.** 1997. Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *J Cell Biol.* **14**;138(1):1-4.

- Bannykh SI, Rowe T, Balch WE.** 1996. The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol.*(1):19-35.
- Barlowe C.** 2002. COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol.* (4):417-22.
- Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R.** 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* (6):895-907.
- Barlowe, C. and R. Schekman.** 1993. SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* **365**:347-349.
- Barr, F. A. and W. B. Huttner.** 1996. A role for ADP-ribosylation factor 1, but not COP I, in secretory vesicle biogenesis from the trans-Golgi network. *FEBS Lett.* **384**:65-70.
- Bauerfeind, R. and W. B. Huttner.** 1993. Biogenesis of constitutive secretory vesicles, secretory granules and synaptic vesicles. *Curr.Opin.Cell Biol.* **5**:628-635.
- Beers MF, Johnson RG, Scarpa A.** 1986. Evidence for an ascorbate shuttle for the transfer of reducing equivalents across chromaffin granule membranes. *J Biol Chem.* **261**(6):2529-35.
- Benjannet, S., J. Lusson, J. Hamelin, D. Savaria, M. Chretien, and N. G. Seidah.** 1995. Structure-function studies on the biosynthesis and bioactivity of the precursor convertase PC2 and the formation of the PC2/7B2 complex. *FEBS Lett.* **362**:151-155.
- Benjannet, S., N. Rondeau, L. Paquet, A. Boudreault, C. Lazure, M. Chretien, and N. G. Seidah.** 1993. Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem.J.* **294** (Pt 3):735-743.
- Bennett MK, Scheller RH.** 1993. The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(7):2559-63.
- Bennett MK, Calakos N, Scheller RH.** 1992. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science.* **257**: 255-9.

- Blazquez, M., C. Thiele, W. B. Huttner, K. Docherty, and K. I. Shennan.** 2000. Involvement of the membrane lipid bilayer in sorting prohormone convertase 2 into the regulated secretory pathway. *Biochem.J.* **349 Pt 3**:843-852.
- Block MR, Glick BS, Wilcox CA, Wieland FT, Rothman JE.** 1988. Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**:7852-6
- Bonifacino, J. S. and A. M. Weissman.** 1998. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **14**:19-57.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F.** 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature.* **348(6297)**:125-32.
- Brakch, N., P. Cohen, and G. Boileau.** 1994. Processing of human prosomatostatin in AtT-20 cells: S-28 and S-14 are generated in different secretory pathways. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **205**:221-229.
- Braks, J. A. and G. J. Martens.** 1994. 7B2 is a neuroendocrine chaperone that transiently interacts with prohormone convertase PC2 in the secretory pathway. *Cell* **78**:263-273.
- Brechler, V., W. N. Chu, J. D. Baxter, G. Thibault, and T. L. Reudelhuber.** 1996. A protease processing site is essential for prorenin sorting to the regulated secretory pathway. *J.Biol.Chem.* **271**:20636-20640.
- Brodsky, J. L. and A. A. McCracken.** 1999. ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin.Cell Dev.Biol.* **10**:507-513.
- Brown, H. A., S. Gutowski, C. R. Moomaw, C. Slaughter, and P. C. Sternweis.** 1993. ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* **75**:1137-1144.
- Bruzzaniti A, Goodge K, Jay P, Taviaux SA, Lam MH, Berta P, Martin TJ, Moseley JM, Gillespie MT.** 1996. PC8 [corrected], a new member of the convertase family. *Biochem J.* **314 (Pt 3)**:727-31.
- Bruzzaniti, A., R. Marx, and R. E. Mains.** 1999. Activation and routing of membrane-tethered prohormone convertases 1 and 2. *J.Biol.Chem.* **274**:24703-24713.

- Cain BM, Vishnuvardhan D, Beinfeld MC. 2001.** Neuronal cell lines expressing PC5, but not PC1 or PC2, process Pro-CCK into glycine-extended CCK 12 and 22. *Peptides*. 22(8):1271-7.
- Canaff, L., V. Brechler, T. L. Reudelhuber, and G. Thibault. 1996.** Secretory granule targeting of atrial natriuretic peptide correlates with its calcium-mediated aggregation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:9483-9487.
- Cawley, N. X., E. Normant, A. Chen, and Y. P. Loh. 2000.** Oligomerization of pro-opiomelanocortin is independent of pH, calcium and the sorting signal for the regulated secretory pathway. *FEBS Lett.* **481**:37-41.
- Chanat, E. and W. B. Huttner. 1991.** Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J.Cell Biol.* **115**:1505-1519.
- Chanat E, Weiss U, Huttner WB, Tooze SA. 1993.** Reduction of the disulfide bond of chromogranin B (secretogranin I) in the trans-Golgi network causes its missorting to the constitutive secretory pathways. *EMBO J.* **2**(5):2159-68.
- Chanat E, Weiss U, Huttner WB. 1994.** The disulfide bond in chromogranin B, which is essential for its sorting to secretory granules, is not required for its aggregation in the trans-Golgi network. *FEBS Lett.* **351**(2):225-30.
- Chen, Y. G., A. Siddhanta, C. D. Austin, S. M. Hammond, T. C. Sung, M. A. Frohman, A. J. Morris, and D. Shields. 1997.** Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *J.Cell Biol.* **138**:495-504.
- Chung, K. N., P. Walter, G. W. Aponte, and H. P. Moore. 1989.** Molecular sorting in the secretory pathway. *Science* **243**:192-197.
- Clary DO, Griff IC, Rothman JE. 1990.** SNAPS, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell.* **61**:709-21.
- Cockcroft, S., G. M. Thomas, A. Fensome, B. Geny, E. Cunningham, I. Gout, I. Hiles, N. F. Totty, O. Truong, and J. J. Hsuan. 1994.** Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science* **263**:523-526.
- Cohn, D. V., R. Zangerle, R. Fischer-Colbrie, L. L. Chu, J. J. Elting, J. W. Hamilton, and H. Winkler. 1982.** Similarity of secretory protein I from parathyroid gland to chromogranin A from adrenal medulla. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **79**:6056-6059.

- Cool, D. R. and Y. P. Loh.** 1998. Carboxypeptidase E is a sorting receptor for prohormones: binding and kinetic studies. *Mol.Cell Endocrinol.* **139**:7-13.
- Cool, D. R., E. Normant, F. Shen, H. C. Chen, L. Pannell, Y. Zhang, and Y. P. Loh.** 1997. Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. *Cell* **88**:73-83.
- Cowley, D. J., Y. R. Moore, D. S. Darling, P. B. Joyce, and S. U. Gorr.** 2000. N- and C-terminal domains direct cell type-specific sorting of chromogranin A to secretory granules. *J.Biol.Chem.* **275**:7743-7748.
- Dahms, N. M. and S. Kornfeld.** 1989. The cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Structural requirements for mannose 6-phosphate binding and oligomerization. *J.Biol.Chem.* **264**:11458-11467.
- Dell'Angelica EC, Mullins C, Bonifacino JS.** 1999. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem.* **274**(11):7278-85.
- De Bie I, M. Marcinkiewicz, D. Malide, C. Lazure, K. Nakayama, M. Bendayan, and N. G. Seidah.** 1996. The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. *J.Cell Biol.* **135**:1261-1275.
- Dittie AS, Thomas L, Thomas G, Tooze SA.** 1997. Interaction of furin in immature secretory granules from neuroendocrine cells with the AP-1 adaptor complex is modulated by casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* **16**(16):4859-70.
- Docherty K, Steiner DF.** 1982. Post-translational proteolysis in polypeptide hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol.* **44**:625-38.
- Eipper, B. A. and R. E. Mains.** 1980. Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocr.Rev.* **1**:1-27.
- Eipper, B. A., R. E. Mains, and C. C. Glembotski.** 1983. Identification in pituitary tissue of a peptide alpha-amidation activity that acts on glycine-extended peptides and requires molecular oxygen, copper, and ascorbic acid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **80**:5144-5148.
- Eipper, B. A., D. A. Stoffers, and R. E. Mains.** 1992. The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Annu.Rev.Neurosci.* **15**:57-85.
- Ellgaard, L., M. Molinari, and A. Helenius.** 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**:1882-1888.

- Englund, P. T.** 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu.Rev.Biochem.* **62**:121-138.
- Fiedler K, Simons K.** 1996. Characterization of VIP36, an animal lectin homologous to leguminous lectins. *109 (Pt 1)*:271-6.
- Flynn GC, Chappell TG, Rothman JE..** 1989. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science.* **245(4916)**:385-90.
- Fra, A. M., C. Fagioli, D. Finazzi, R. Sitia, and C. M. Alberini.** 1993. Quality control of ER synthesized proteins: an exposed thiol group as a three-way switch mediating assembly, retention and degradation. *EMBO J.* **12**:4755-4761.
- Fricker, L. D.** 1988. Activation and membrane binding of carboxypeptidase E. *J.Cell Biochem.* **38**:279-289.
- Fricker, L. D., B. Das, R. S. Klein, D. Greene, and Y. K. Jung.** 1991. Regulation of carboxypeptidase E (enkephalin convertase). *NIDA Res.Monogr* **111**:171-187.
- Fricker LD, McKinzie AA, Sun J, Curran E, Qian Y, Yan L, Patterson SD, Courchesne PL, Richards B, Levin N, Mzhavia N, Devi LA, Douglass J.** 2000. Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing. *J Neurosci.* **20(2)**:639-48.
- Gainer H, Russell JT, Loh YP.** 1985. The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing: the secretory vesicle hypothesis. *Neuroendocrinology.* **40(2)**:171-84.
- Glombik, M. M., A. Kromer, T. Salm, W. B. Huttner, and H. H. Gerdes.** 1999. The disulfide-bonded loop of chromogranin B mediates membrane binding and directs sorting from the trans-Golgi network to secretory granules. *EMBO J.* **18**:1059-1070.
- Goodman, L. J. and C. M. Gorman.** 1994. Autoproteolytic activation of the mouse prohormone convertase mPC1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **201**:795-804.
- Gorr, S. U., X. F. Huang, D. J. Cowley, R. Kuliawat, and P. Arvan.** 1999. Disruption of disulfide bonds exhibits differential effects on trafficking of regulated secretory proteins. *Am.J.Physiol* **277**:C121-C131.

- Gumbiner, B. and R. B. Kelly.** 1982. Two distinct intracellular pathways transport secretory and membrane glycoproteins to the surface of pituitary tumor cells. *Cell* **28**:51-59.
- Halban, P. A. and J. C. Irminger.** 1994. Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem.J.* **299** (Pt 1):1-18.
- Hammond C, Helenius A.** 1994. Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science.* (5184):456-8.
- Hay, J. C. and R. H. Scheller.** 1997. SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**:505-512.
- Hebert, D. N., B. Foellmer, and A. Helenius.** 1995. Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81**:425-433.
- Helle, K. B., R. K. Reed, M. Ehrhart, D. Aunis, and A. R. Hogue.** 1990. Chromogranin A: osmotically active fragments and their susceptibility to proteolysis during lysis of the bovine chromaffin granules. *Acta Physiol Scand.* **138**:565-574.
- Huang, X. F. and P. Arvan.** 1995. Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. *J.Biol.Chem.* **270**:20417-20423.
- Huttner, W. B. and S. Natori.** 1995. Regulated secretion. Helper proteins for neuroendocrine secretion. *Curr.Biol.* **5**:242-245.
- Iacangelo AL, Eiden LE.** 1995. Chromogranin A: current status as a precursor for bioactive peptides and a granulogenic/sorting factor in the regulated secretory pathway. *Regul Pept.* **58**(3):65-88.
- Irminger JC, Verchere CB, Meyer K, Halban PA.** 1997. Proinsulin targeting to the regulated pathway is not impaired in carboxypeptidase E-deficient Cpefat/Cpefat mice. *J Biol Chem.* **272**(44):27532-4.
- Jentoft, N.** 1990. Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem.Sci.* **15**:291-294.
- Judah JD, Gamble M, Steadman JH.** 1973. Biosynthesis of serum albumin in rat liver. Evidence for the existence of 'proalbumin'. *Biochem J.* **34**(4):1083-91.
- Judah JD, Quinn PS.** 1978. Calcium ion-dependent vesicle fusion in the conversion of proalbumin to albumin. *Nature.* **271**(5643):384-5.

- Jutras I, Seidah NG, Reudelhuber TL, Brechler V.** 1997. Two activation states of the prohormone convertase PC1 in the secretory pathway. *J Biol Chem.* **272**(24):15184-8.
- Jutras, I., N. G. Seidah, and T. L. Reudelhuber.** 2000. A predicted alpha -helix mediates targeting of the proprotein convertase PC1 to the regulated secretory pathway. *J.Biol.Chem.* **275**:40337-40343.
- Karrenbauer, A., D. Jeckel, W. Just, R. Birk, R. R. Schmidt, J. E. Rothman, and F. T. Wieland.** 1990. The rate of bulk flow from the Golgi to the plasma membrane. *Cell* **63**:259-267.
- Kelly, R. B.** 1985. Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* **230**:25-32.
- Kelly, R. B.** 1991. Secretory granule and synaptic vesicle formation. *Curr.Opin.Cell Biol.* **3**:654-660.
- Kiefer, M. C., J. E. Tucker, R. Joh, K. E. Landsberg, D. Saltman, and P. J. Barr.** 1991. Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol.* **10**:757-769.
- Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP.** 2001. Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell.* 2001 **106**(4):499-509.
- Kopito, R. R.** 1997. ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* **88**:427-430.
- Kornfeld, S.** 1998. Diseases of abnormal protein glycosylation: an emerging area. *J.Clin.Invest* **101**:1293-1295.
- Kornfeld R, Kornfeld S.** 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* **54**:631-64.
- Kreiss, D. S. and I. Lucki.** 1992. Desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors by chronic administration of 8-OH-DPAT. *Neuropharmacology* **31**:1073-1076.
- Kreis TE, Lowe M, Pepperkok R.** 1995. COPs regulating membrane traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **11**:677-706.
- Krysan DJ, Rockwell NC, Fuller RS.** 1999. Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides. *J Biol Chem.* **274**(33):23229-34.

- Kromer A, Glombik MM, Huttner WB, Gerdes HH.** 1998. Essential role of the disulfide-bonded loop of chromogranin B for sorting to secretory granules is revealed by expression of a deletion mutant in the absence of endogenous granin synthesis. *J Cell Biol.* 140(6):1331-46.
- Kuliawat, R. and P. Arvan.** 1994. Distinct molecular mechanisms for protein sorting within immature secretory granules of pancreatic beta-cells. *J.Cell Biol.* 126:77-86.
- Lamango NS, Apletalina E, Liu J, Lindberg I.** 1999. The proteolytic maturation of prohormone convertase 2 (PC2) is a pH-driven process. *Arch Biochem Biophys.* 362(2):275-82.
- Lamango NS, Zhu X, Lindberg I.** 1996. Purification and enzymatic characterization of recombinant prohormone convertase 2: stabilization of activity by 21 kDa 7B2. *Arch Biochem Biophys.* 330(2):238-50.
- Lazure, C., S. Benjannet, N. G. Seidah, and M. Chretien.** 1991. Processed forms of neuroendocrine proteins 7B2 and secretogranin II are found in porcine pituitary extracts. *Int.J.Pept.Protein Res.* 38:392-400.
- Le Borgne, R., G. Griffiths, and B. Hoflack.** 1996. Mannose 6-phosphate receptors and ADP-ribosylation factors cooperate for high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with membranes. *J.Biol.Chem.* 271:2162-2170.
- Leduc, R., S. S. Molloy, B. A. Thorne, and G. Thomas.** 1992. Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J.Biol.Chem.* 267:14304-14308.
- Lee, M. S., Y. L. Zhu, J. E. Chang, and P. S. Dannies.** 2001. Acquisition of Lubrol insolubility, a common step for growth hormone and prolactin in the secretory pathway of neuroendocrine cells. *J.Biol.Chem.* 276:715-721.
- Letourneur F, Gaynor EC, Hennecke S, Demolliere C, Duden R, Emr SD, Riezman H, Cosson P.** 1994. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell.* 79(7):1199-207.
- Levine M, Morita K, Pollard H.** 1985. Enhancement of norepinephrine biosynthesis by ascorbic acid in cultured bovine chromaffin cells. *J Biol Chem.* 260(24):12942-7.
- Leyte, A., F. A. Barr, R. H. Kehlenbach, and W. B. Huttner.** 1992. Multiple trimeric G-proteins on the trans-Golgi network exert stimulatory and inhibitory effects on secretory vesicle formation. *EMBO J.* 11:4795-4804.

- Lian JP, Stone S, Jiang Y, Lyons P, Ferro-Novick S.** 1994. Ypt1p implicated in v-SNARE activation. *Nature*. 372(6507):698-701.
- Lindberg I, Ahn SC, Breslin MB.** 1994. Cellular distributions of the prohormone processing enzymes PC1 and PC2. *Mol Cell Neurosci*.5(6):614-22.
- Lindberg I, van den Hurk WH, Bui C, Batie CJ.** 1995. Enzymatic characterization of immunopurified prohormone convertase 2: potent inhibition by a 7B2 peptide fragment. *Biochemistry*. 34(16):5486-93.
- Lynch DR, Snyder SH.**1986. Neuropeptides: multiple molecular forms, metabolic pathways, and receptors. *Annu Rev Biochem*.55:773-99.
- Lupashin VV, Waters MG.** 1997. t-SNARE activation through transient interaction with a rab-like guanosine triphosphatase. *Science*. 276(5316):1255-8.
- Lusson J, Benjannet S, Hamelin J, Savaria D, Chretien M, Seidah NG.**1997.The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking.*Biochem J*. 326 (Pt 3):737-44.
- Lusson, J., D. Vieau, J. Hamelin, R. Day, M. Chretien, and N. G. Seidah.** 1993. cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:6691-6695.
- Ma, J., M. Simonovic, R. Qian, and K. J. Colley.** 1999. Sialyltransferase isoforms are phosphorylated in the cis-medial Golgi on serine and threonine residues in their luminal sequences. *J.Biol.Chem*. 274:8046-8052.
- Machamer, C. E.** 1993. Targeting and retention of Golgi membrane proteins. *Curr.Opin.Cell Biol*. 5:606-612.
- Mains RE, Eipper BA.** 1984. Secretion and regulation of two biosynthetic enzyme activities, peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase and a carboxypeptidase, by mouse pituitary corticotropic tumor cells. *Endocrinology*. 115(5):1683-90.
- Mains RE, Eipper BA.** Phosphorylation of rat and human adrenocorticotropin-related peptides: physiological regulation and studies of secretion. 1983. *Endocrinology*.112(6):1986-95.

- Matsuoka K, Morimitsu Y, Uchida K, Schekman R.** 1998. Coat assembly directs v-SNARE concentration into synthetic COPII vesicles. *Mol Cell.* 2(5):703-8.
- Mayer MP, Bukau B.** 1998. Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biol Chem.* (3):261-8.
- Marsh M, McMahon HT.** **The structural era of endocytosis.** *Science.* 1999. 285(5425):215-20.
- Mbikay, M., N. G. Seidah, M. Chretien, and E. M. Simpson.** 1995. Chromosomal assignment of the genes for proprotein convertases PC4, PC5, and PACE 4 in mouse and human. *Genomics* 26:123-129.
- Mbikay M, Raffin-Sanson ML, Tadros H, Sirois F, Seidah NG, Chretien M.** 1994. Structure of the gene for the testis-specific proprotein convertase 4 and of its alternate messenger RNA isoforms. *Genomics.* 20(2):231-7.
- McNew, J. A., F. Parlati, R. Fukuda, R. J. Johnston, K. Paz, F. Paumet, T. H. Sollner, and J. E. Rothman.** 2000. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407:153-159.
- Meerabux, J., M. L. Yaspo, A. J. Roebroek, W. J. van de Ven, T. A. Lister, and B. D. Young.** 1996. A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at a chromosome translocation breakpoint in lymphomas. *Cancer Res.* 56:448-451.
- Melkonian, K. A., A. G. Ostermeyer, J. Z. Chen, M. G. Roth, and D. A. Brown.** 1999. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J.Biol.Chem.* 274:3910-3917.
- Meyer DI, Krause E, Dobberstein B.** 1982. Secretory protein translocation across membranes-the role of the "docking protein". *Nature.* 297(5868):647-50.
- Miller SG, Moore HP.** 1990. Regulated secretion. *Curr Opin Cell Biol.* 2(4):642-7
- Molloy, S. S., E. D. Anderson, F. Jean, and G. Thomas.** 1999. Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol.* 9:28-35.
- Molloy, S. S., L. Thomas, J. K. VanSlyke, P. E. Stenberg, and G. Thomas.** 1994. Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein

convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J.* **13**:18-33.

Moore, H. P., M. D. Walker, F. Lee, and R. B. Kelly. 1983. Expressing a human proinsulin cDNA in a mouse ACTH-secreting cell. Intracellular storage, proteolytic processing, and secretion on stimulation. *Cell* **35**:531-538.

Mori, K., S. Kii, A. Tsuji, M. Nagahama, A. Imamaki, K. Hayashi, T. Akamatsu, H. Nagamune, and Y. Matsuda. 1997. A novel human PACE4 isoform, PACE4E is an active processing protease containing a hydrophobic cluster at the carboxy terminus. *J.Biochem.(Tokyo)* **121**:941-948.

Muller L, Zhu X, Lindberg I. 1997. Mechanism of the facilitation of PC2 maturation by 7B2: involvement in ProPC2 transport and activation but not folding. *J Cell Biol.* **139**(3):625-38.

Muniz, M. and H. Riezman. 2000. Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *EMBO J.* **19**:10-15.

Munro, S. 1995. An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *EMBO J.* **14**:4695-4704.

Munzer, J. S., A. Basak, M. Zhong, A. Mamarbachi, J. Hamelin, D. Savaria, C. Lazure, G. N. Hendy, S. Benjannet, M. Chretien, and N. G. Seidah. 1997. In vitro characterization of the novel proprotein convertase PC7. *J.Biol.Chem.* **272**:19672-19681.

Naggert, J. K., L. D. Fricker, O. Varlamov, P. M. Nishina, Y. Rouille, D. F. Steiner, R. J. Carroll, B. J. Paigen, and E. H. Leiter. 1995. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat.Genet.* **10**:135-142.

Nakagawa, T., M. Hosaka, S. Torii, T. Watanabe, K. Murakami, and K. Nakayama. 1993. Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE4. *J.Biochem.(Tokyo)* **113**:132-135.

Nakagawa, T., K. Murakami, and K. Nakayama. 1993. Identification of an isoform with an extremely large Cys-rich region of PC6, a Kex2-like processing endoprotease. *FEBS Lett.* **327**:165-171.

Nakayama, K. 1997. Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem.J.* **327** (Pt 3):625-635.

- Nakayama, K., W. S. Kim, S. Torii, M. Hosaka, T. Nakagawa, J. Ikemizu, T. Baba, and K. Murakami.** 1992. Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. Its testis-specific expression. *J.Biol.Chem.* **267**:5897-5900.
- Nakano A, Muramatsu M.** 1989. A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol.* **109**: 2677-91.
- Nakano A, Brada D, Schekman R.** 1988. A membrane glycoprotein, Sec12p, required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol.* **107**:851-63.
- Nauseef, W. M., S. J. McCormick, and R. A. Clark.** 1995. Calreticulin functions as a molecular chaperone in the biosynthesis of myeloperoxidase. *J.Biol.Chem.* **270**:4741-4747.
- Neurath H.** 1989. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem Sci.* **14**(7):268-71.
- Niehurs, C. and W. B. Huttner.** 1990. Purification and characterization of tyrosylprotein sulfotransferase. *EMBO J.* **9**:35-42.
- Nilsson T, Slusarewicz P, Hoe MH, Warren G.** 1993. Kin recognition. A model for the retention of Golgi enzymes. *FEBS Lett.* **330**(1):1-4.
- Nour, N., A. Basak, M. Chretien, and N. G. Seidah.** 2003. Structure-function analysis of the prosegment of the proprotein convertase PC5A. *J.Biol.Chem.* **278**:2886-2895.
- O'Connor DT, Deftos LJ.** 1986. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. *N Engl J Med* **314**(18):1145-51.
- Orci, L., M. Ravazzola, M. Amherdt, O. Madsen, A. Perrelet, J. D. Vassalli, and R. G. Anderson.** 1986. Conversion of proinsulin to insulin occurs coordinately with acidification of maturing secretory vesicles. *J.Cell Biol.* **103**:2273-2281.
- Orci L, Stamnes M, Ravazzola M, Amherdt M, Perrelet A, Sollner TH, Rothman JE.** 1997. Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell.* **90**(2):335-49
- Ottiger, H. P., E. F. Battenberg, A. P. Tsou, F. E. Bloom, and J. G. Sutcliffe.** 1990. 1B1075: a brain- and pituitary-specific mRNA that encodes a novel chromogranin/secretogranin-like component of intracellular vesicles. *J.Neurosci.* **10**:3135-3147.

- Ou, W. J., P. H. Cameron, D. Y. Thomas, and J. J. Bergeron.** 1993. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* **364**:771-776.
- Quinn PS, Gamble M, Judah JD.** 1975. Biosynthesis of serum albumin in rat liver. Isolation and probable structure of 'proalbumin' from rat liver. *Biochem J.* **146**(2):389-93.
- Paquet, L., F. Bergeron, A. Boudreault, N. G. Seidah, M. Chretien, M. Mbikay, and C. Lazure.** 1994. The neuroendocrine precursor 7B2 is a sulfated protein proteolytically processed by a ubiquitous furin-like convertase. *J.Biol.Chem.* **269**:19279-19285.
- Paquet, L., N. Rondeau, N. G. Seidah, C. Lazure, M. Chretien, and M. Mbikay.** 1991. Immunological identification and sequence characterization of a peptide derived from the processing of neuroendocrine protein 7B2. *FEBS Lett.* **294**:23-26.
- Pelham HR.** Getting through the Golgi complex. 1998. *Trends Cell Biol.* **8**(1):45-9.
- Pelham, H. R.** 1995. Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr.Opin.Cell Biol.* **7**:530-535.
- Pelham, H. R. and S. Munro.** 1993. Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. *Cell* **75**:603-605.
- Plempner, R. K., S. Bohmler, J. Bordallo, T. Sommer, and D. H. Wolf.** 1997. Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* **388**:891-895.
- Rapoport, T. A., M. M. Rolls, and B. Jungnickel.** 1996. Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr.Opin.Cell Biol.* **8**:499-504.
- Ravichandran V, Chawla A, Roche PA.** 1996. Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin/VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues. *J Biol Chem* **271**:13300-3.
- Rindler, M. J.** 1992. Biogenesis of storage granules and vesicles. *Curr.Opin.Cell Biol.* **4**:616-622.
- Rindler, M. J.** 1998. Carboxypeptidase E, a peripheral membrane protein implicated in the targeting of hormones to secretory granules, co-aggregates with granule content proteins at acidic pH. *J.Biol.Chem.* **273**:31180-31185.

- Roebroek, A. J., J. A. Schalken, J. A. Leunissen, C. Onnekink, H. P. Bloemers, and W. J. van de Ven.** 1986. Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *EMBO J.* **5**:2197-2202.
- Rothman JE, Wieland FT.** 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science.* **272**(5259):227-34.
- Rouille Y, Duguay SJ, Lund K, Furuta M, Gong Q, Lipkind G, Oliva AA Jr, Chan SJ, Steiner DF.** 1995. Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Front Neuroendocrinol.* **16**(4):322-61.
- Saraste J, Kuismanen E.** 1984. Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell.* **38**(2):535-49.
- Schagger H, von Jagow G.** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. 1987. *Anal Biochem* **166**(2):368-79.
- Schmidt, A., M. J. Hannah, and W. B. Huttner.** 1997. Synaptic-like microvesicles of neuroendocrine cells originate from a novel compartment that is continuous with the plasma membrane and devoid of transferrin receptor. *J. Cell Biol.* **137**:445-458.
- Schutze, M. P., P. A. Peterson, and M. R. Jackson.** 1994. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **13**:1696-1705.
- Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, Chretien M.** 2003. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**(3):928-33.
- Seidah, N. G., S. Benjannet, J. Hamelin, A. M. Mamarbachi, A. Basak, J. Marcinkiewicz, M. Mbikay, M. Chretien, and M. Marcinkiewicz.** 1999. The subtilisin/kexin family of precursor convertases. Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the novel enzyme SKI-1. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **885**:57-74.
- Seidah NG, Chretien M.** 1999. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* **848**(1-2):45-62.

- Seidah NG, Hamelin J, Mamarbachi M, Dong W, Tardos H, Mbikay M, Chretien M, Day R.** 1996. cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**(8):3388-93.
- Seidah NG, Chretien M, Day R.** 1994. The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie.* **76**(3-4):197-209.
- Seidah, N. G., R. Day, J. Hamelin, A. Gaspar, M. W. Collard, and M. Chretien.** 1992. Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol.Endocrinol.* **6**:1559-1570.
- Seidah, N. G., R. Day, M. Marcinkiewicz, and M. Chretien.** 1998. Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **839**:9-24.
- Seidah, N. G., L. Gaspar, P. Mion, M. Marcinkiewicz, M. Mbikay, and M. Chretien.** 1990. cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol.* **9**:789.
- Seidah, N. G., M. Marcinkiewicz, S. Benjannet, L. Gaspar, G. Beaubien, M. G. Mattei, C. Lazure, M. Mbikay, and M. Chretien.** 1991. Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol.Endocrinol.* **5**:111-122.
- Seidah, N. G., M. G. Mattei, L. Gaspar, S. Benjannet, M. Mbikay, and M. Chretien.** 1991. Chromosomal assignments of the genes for neuroendocrine convertase PC1 (NEC1) to human 5q15-21, neuroendocrine convertase PC2 (NEC2) to human 20p11.1-11.2, and furin (mouse 7[D1-E2] region). *Genomics* **11**:103-107.
- Shen FS, Loh YP.** 1997. Intracellular misrouting and abnormal secretion of adrenocorticotropin and growth hormone in cpefat mice associated with a carboxypeptidase E mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(10):5314-9.
- Shinde U, Li Y, Chatterjee S, Inouye M.** 1993. Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(15):6924-8.

- Sigafoos, J., W. G. Chestnut, B. M. Merrill, L. C. Taylor, E. J. Diliberto, Jr., and O. H. Viveros.** 1993. Identification of a 7B2-derived tridecapeptide from bovine adrenal medulla chromaffin vesicles. *Cell Mol. Neurobiol.* **13**:271-278.
- Silen, J. L. and D. A. Agard.** 1989. The alpha-lytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain in vivo. *Nature* **341**:462-464.
- Smeekens, S. P. and D. F. Steiner.** 1990. Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J. Biol. Chem.* **265**:2997-3000.
- Sohn K, Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Bremser M, Lottspeich F, Fiedler K, Helms JB, Wieland FT.** 1996. A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatamer binding. *J Cell Biol.* **135**(5):1239-48.
- Solimena, M., R. Dirkx, Jr., J. M. Hermel, S. Pleasic-Williams, J. A. Shapiro, L. Caron, and D. U. Rabin.** 1996. ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *EMBO J.* **15**:2102-2114.
- Song L, Fricker LD.** Cloning and expression of human carboxypeptidase Z, a novel metallocarboxypeptidase. 1997. *J Biol Chem.* **272**(16):10543-50.
- Sousa MC, Ferrero-Garcia MA, Parodi AJ.** 1992. Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry.* **31**:97-105.
- Springer S, Spang A, Schekman R.** 1999. A primer on vesicle budding. *Cell.* **97**:145-8.
- Stamnes, M. A. and J. E. Rothman.** 1993. The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell* **73**:999-1005.
- Steiner DF, Kemmler W, Tager HS, Peterson JD.** 1974. Proteolytic processing in the biosynthesis of insulin and other proteins. *Fed Proc.* (10):2105-15.
- Steiner DF.** The proprotein convertases. 1998. *Curr Opin Chem Bio.* **12**(1):31-9.
- Suzuki, T., Q. Yan, and W. J. Lennarz.** 1998. Complex, two-way traffic of molecules across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **273**:10083-10086.

- Tagaya M, Genma T, Yamamoto A, Kozaki S, Mizushima S.** 1996. SNAP-25 is present on chromaffin granules and acts as a SNAP receptor. *FEBS Lett.* **394**(1):83-6.
- Tam, W. W., K. I. Andreasson, and Y. P. Loh.** 1993. The amino-terminal sequence of pro-opiomelanocortin directs intracellular targeting to the regulated secretory pathway. *Eur.J.Cell Biol.* **62**:294-306.
- Taugner, R. and E. Hackenthal.** 1988. On the character of the secretory granules in juxtaglomerular epithelioid cells. *Int.Rev.Cytol.* **110**:93-131.
- Taugner, R., K. Murakami, and S. J. Kim.** 1986. Renin activation in juvenile secretory granules? Immunocytochemical experiments with an antiserum directed against the prosegment of human renin. *Histochemistry* **85**:107-109.
- Taupenot, L., K. L. Harper, and D. T. O'Connor.** 2003. The chromogranin-secretogranin family. *N.Engl.J.Med.* **348**:1134-1149.
- Thiele, C., H. H. Gerdes, and W. B. Huttner.** 1997. Protein secretion: puzzling receptors. *Curr.Biol.* **7**:R496-R500.
- Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB.** 2000. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Bio.* **12**(1):42-9.
- Thiele C, Huttner WB.** 1998. Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to secretory granules-recent developments. *Semin Cell Dev Biol.* **9**(5):511-6.
- Tooze, S. A. and W. B. Huttner.** 1990. Cell-free protein sorting to the regulated and constitutive secretory pathways. *Cell* **60**:837-847.
- Tooze, S. A. and J. C. Stinchcombe.** 1992. Biogenesis of secretory granules. *Semin.Cell Biol.* **3**:357-366.
- Tooze, S. A., J. Tooze, and G. Warren.** 1988. Site of addition of N-acetyl-galactosamine to the E1 glycoprotein of mouse hepatitis virus-A59. *J.Cell Biol.* **106**:1475-1487.
- Tooze SA, Flatmark T, Tooze J, Huttner WB.** 1991. Characterization of the immature secretory granule, an intermediate in granule biogenesis. *J Cell Biol.* **115**(6):1491-503.
- Toure, B. B., J. S. Munzer, A. Basak, S. Benjannet, J. Rochemont, C. Lazure, M. Chretien, and N. G. Seidah.** 2000. Biosynthesis and enzymatic

characterization of human SKI-1/S1P and the processing of its inhibitory prosegment. *J.Biol.Chem.* **275**:2349-2358.

van den Ouweland, A. M., H. L. van Duijnhoven, G. D. Keizer, L. C. Dorssers, and W. J. van de Ven. 1990. Structural homology between the human fur gene product and the subtilisin-like protease encoded by yeast KEX2. *Nucleic Acids Res.* **18**:664.

Tsuji A, Hine C, Tamai Y, Yonemoto K, Mori K, Yoshida S, Bando M, Sakai E, Mori K, Akamatsu T, Matsuda Y. 1997. Genomic organization and alternative splicing of human PACE4 (SPC4), kexin-like processing endoprotease. *J Biochem (Tokyo).* **122**(2):438-52.

Tsuji A, Mori K, Hine C, Tamai Y, Nagamune H, Matsuda Y. 1994. The tissue distribution of mRNAs for the PACE4 isoforms, kexin-like processing protease: PACE4C and PACE4D mRNAs are major transcripts among PACE4 isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* **202**(3):1215-21.

Varki A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.* **3**(2):97-130.

Varlamov, O., L. D. Fricker, H. Furukawa, D. F. Steiner, S. H. Langley, and E. H. Leiter. 1997. Beta-cell lines derived from transgenic Cpe(fat)/Cpe(fat) mice are defective in carboxypeptidase E and proinsulin processing. *Endocrinology* **138**:4883-4892.

Vindrola, O. and I. Lindberg. 1992. Biosynthesis of the prohormone convertase mPC1 in AtT-20 cells. *Mol.Endocrinol.* **6**:1088-1094.

Varlamov O, Fricker LD. 1996. The C-terminal region of carboxypeptidase E involved in membrane binding is distinct from the region involved with intracellular routing. *J Biol Chem.* **271**(11):6077-83.

von Zastrow M, Tritton TR, Castle JD. 1986. Exocrine secretion granules contain peptide amidation activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**(10):3297-301.

Walter, P. and A. E. Johnson. 1994. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu.Rev.Cell Biol.* **10**:87-119.

Walter P, Lingappa VR. 1986. Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol.* **2**:499-516.

- Wan, L., S. S. Molloy, L. Thomas, G. Liu, Y. Xiang, S. L. Rybak, and G. Thomas.** 1998. PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell* **94**:205-216.
- Wang, Y., C. Thiele, and W. B. Huttner.** 2000. Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic* **1**:952-962.
- Wasmeier, C. and J. C. Hutton.** 1996. Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J.Biol.Chem.* **271**:18161-18170.
- Wieland FT, Gleason ML, Serafini TA, Rothman JE.** 1987. The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell.* **50**(2):289-300.
- Winkler, H. and R. Fischer-Colbrie.** 1992. The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* **49**:497-528.
- Xiang Y, Molloy SS, Thomas L, Thomas G.** 2000. The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments. *Mol Biol Cell.* **11**(4):1257-73.
- Yabuta Y, Takagi H, Inouye M, Shinde U.** 2001. Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: propeptide release modulates activation precision of pro-subtilisin. *J Biol Chem.* **276**(48):44427-34. Epub 2001 Sep 27.
- Zapun A, Petrescu SM, Rudd PM, Dwek RA, Thomas DY, Bergeron JJ.** 1997. Conformation-independent binding of monoglucosylated ribonuclease B to calnexin. *Cell.* **88**: 29-38.
- Zapun A, Jakob CA, Thomas DY, Bergeron JJ.** 1999. Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure Fold Des.* **(8)**:R173-82.
- Zapun A, Darby NJ, Tessier DC, Michalak M, Bergeron JJ, Thomas DY.** 1998. Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J Biol Chem.* **273**(11):6009-12.
- Zhou, A. and R. E. Mains.** 1994. Endoproteolytic processing of proopiomelanocortin and prohormone convertases 1 and 2 in neuroendocrine cells overexpressing prohormone convertases 1 or 2. *J.Biol.Chem.* **269**:17440-17447.

- Zhou, A., S. Martin, G. Lipkind, J. LaMendola, and D. F. Steiner.** 1998. Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J.Biol.Chem.* **273**:11107-11114.
- Zhou, A., G. Webb, X. Zhu, and D. F. Steiner.** 1999. Proteolytic processing in the secretory pathway. *J.Biol.Chem.* **274**:20745-20748.
- Zhou, Y. and I. Lindberg.** 1993. Purification and characterization of the prohormone convertase PC1(PC3). *J.Biol.Chem.* **268**:5615-5623.
- Zhou, Y. and I. Lindberg.** 1994. Enzymatic properties of carboxyl-terminally truncated prohormone convertase 1 (PC1/SPC3) and evidence for autocatalytic conversion. *J.Biol.Chem.* **269**:18408-18413.
- Zhou, Y., C. Rovere, P. Kitabgi, and I. Lindberg.** 1995. Mutational analysis of PC1 (SPC3) in PC12 cells. 66-kDa PC1 is fully functional. *J.Biol.Chem.* **270**:24702-24706.
- Zhu, X., N. S. Lamango, and I. Lindberg.** 1996. Involvement of a polyproline helix-like structure in the interaction of 7B2 with prohormone convertase 2. *J.Biol.Chem.* **271**:23582-23587.
- Zhu, X. and I. Lindberg.** 1995. 7B2 facilitates the maturation of proPC2 in neuroendocrine cells and is required for the expression of enzymatic activity. *J.Cell Biol.* **129**:1641-1650.
- Zhu, X., Y. Rouille, N. S. Lamango, D. F. Steiner, and I. Lindberg.** 1996. Internal cleavage of the inhibitory 7B2 carboxyl-terminal peptide by PC2: a potential mechanism for its inactivation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:4919-4924.
- Zhu, X. L., Y. Ohta, F. Jordan, and M. Inouye.** 1989. Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature* **339**:483-484.

